UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

EFEITO DOS NÍVEIS DE COBRE DE FONTE ORGÂNICA SOBRE A MORFOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL DE PINTAINHAS POEDEIRAS

RAFAEL VICTOR NUNES LIMA

RECIFE - PE
SETEMBRO 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Efeito dos níveis de cobre de fonte orgânica sobre a morfologia da mucosa intestinal de pintainhas poedeiras

Rafael Victor Nunes Lima
Graduando

Prof. Dr. Carlos Bôa-viagem Rabello
Orientador

Ma. Katariny Lima de Abreu
Coorientadora

RECIFE - PE
SETEMBRO 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

L732e Lima, Rafael Victor Nunes.
Efeito dos níveis de cobre de fonte orgânica sobre a morfologia da mucosa intestinal de pintainhas poedeiras / Rafael Victor Nunes Lima. – Recife, 2024.
57 f.; il.

Orientador(a): Carlos Bôa-viagem Rabello.
Co-orientador(a): Katariny Lima de Abreu.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Zootecnia, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Aminoácidos. 2. Intestinos. 3. Histologia. 4. Minerais I. Rabello, Carlos Bôa-viagem, orient. II. Abreu, Katariny Lima de, coorient. III. Título

CDD 636

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM ZOOTECNIA

RAFAEL VICTOR NUNES LIMA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Zootecnia como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em 12/09/2024

Examinadores:

_____

Prof. Dr. Carlos Bôa-viagem Rabello
Orientador

_____

Profa. Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza
Examinador I

_____

Dra. Jamille Sheila da Silva Wanderley
Examinador II

_____

Profa. Dra. Helena Emília Cavalcanti da Costa Cordeiro Manso
Suplente

Assim como Clarice Lispector me convidou a explorar as profundezas da alma humana e a beleza dos pequenos momentos da vida, vocês me ensinaram a ver a mundo com olhos mais atentos e coração mais aberto. Em suas palavras e gestos, encontro a essência do amor e da sabedoria, refletindo a serenidade e as forças presentes nas páginas de Clarice. Vocês foram porto seguro, me mostraram o quanto puderam, todos os dias, que a verdadeira felicidade está no que cultivamos, com todo amor e gratidão, dedico-lhes Dona Silvia, Zé do Fogão e Seu Elias.

(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força, perseverança, resiliência e saúde que tem me dado para ter chegado até onde cheguei.

A Mainha e Painho, por serem minha fortaleza, meu apoio, por sempre estarem comigo em todos os momentos que precisei, em cada dia difícil, eu amo vocês. Agradecer aos meus irmãos, Everton Matheus, Ana Larissa e Maria Beatriz, por se fazerem presentes em toda a caminhada.

Agradecer a Érika Aureliano, em nome de toda minha família, por todo o apoio que tem me dado, por ser uma inspiração de pessoa e profissional, seu cuidado e preocupação mesmo de longe, me faz se sentir perto de casa. Muito obrigado por confiar e nunca desistir de mim.

Quero agradecer ao meu amor, Matheus Henrique, por todo apoio, confiança, amizade, determinação e carinho, sei que não foi fácil aguentar todos os surtos e estresses durante esses 5 anos, e que sem você nada disso seria possível.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Zootecnia, por todos os serviços prestados, por ser minha casa durante os anos de graduação e agradecer por todas aventuras e conhecimentos obtidos neste espaço, em especial aos docentes do curso de Zootecnia, por serem profissionais capacitados e dedicados. Agradeço a Pró-Reitoria de Gestão Estudantil e Inclusão (PROGESTI), por ter me fornecido a bolsa de assistência estudantil, que graças a vocês consegui permanecer durante os 5 anos de graduação. Agradeço a Fundação de Amparo a Ciência de Pernambuco (FACEPE) pela concessão das bolsas de iniciação cientifica, que permaneci como bolsista durante 3 anos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Bôa-viagem Rabello, pelos ensinamentos e confiança, pela compreensão e por ser um magnífico profissional que inspira, por apresentar a avicultura e as possibilidades que esta área nos permite, por sempre aceitar de alguma forma minhas ideias mirabolantes e me permitir a pesquisa cientifica. A Profa. Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza por toda confiança, ensinamentos, parceria, apoio e por sempre acreditar mais em mim do que eu mesmo em muitas situações. Seu amor pelas aves me cativou da mesma forma, muito obrigado.

Às minhas amigas, Jamile Sheila e Katariny Lima, meu eterno agradecimento por tudo, por todo apoio durante a graduação, pelas risadas, por dividir essa trajetória comigo,

pela cumplicidade e carinho que recebo de vocês, obrigado por todo cuidado e atenção, vocês são muito especiais para mim. À Gabriela Duarte, meus agradecimentos, por todo apoio e confiança, agradeço por todo conhecimento obtido contigo, pela sua paciência em ensinar, uma profissional incrível. Ao RED, Maria Eduarda e Danielle Maria, vocês estiveram ao meu lado em cada etapa desta jornada acadêmica, oferecendo apoio incondicional, incentivo constante e, acima de tudo, uma amizade verdadeira. Nas noites de estudo, nas discussões acadêmicas e nos momentos de desânimo, vocês foram as responsáveis por me manter motivado e focado, mesmo provando o quanto eu sou ansioso e sofro por antecedência. Obrigado por fazerem parte desta trajetória e por serem a minha rede de apoio durante toda a universidade. A João Pedro, por ser e continuar sendo um braço direito, desde o segundo semestre nossa amizade e que ela permaneça por muito tempo.

A Ana Carolina Gonzaga, por ser minha extensão na Bahia, por sempre permanecer comigo, desde o 9º ano ouvindo meus desesperos, participando dos meus sucessos e derrotas, e por sempre estar comigo e acompanhando todo processo de pertinho (mesmo estando longe).

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisa com Aves. Aos amigos que a Zootecnia me presenteou, Luiz Wilker, Ana Gabriela, Deborah, Bruna, Hiasmyn, Eduarda, Salmo, Yasmin, Maria Victoria, Adrielle, Elton, Webert, Darlan, Andrea Marques.

Agradeço a Rabia (*in memoriam*), você foi um anjo que entrou em nossas vidas e trouxe alegria contagiante, seu sorriso que tirava qualquer um da tristeza. Panterona, o tanto que você falava que eu iria ser um nojo com esse diploma e tu não estais aqui para ver isso, mas sabe que serei eternamente grato por cada sorriso juntos.

Ao Programa de Educação Tutorial em Zootecnia (PET), programa que tenho eterno carinho, a todos os amigos que fiz durante o programa e a todo o aprendizado obtido. Aos meus amigos de turma, Gildo, Isaque e Claudenice, vocês são profissionais e pessoas incríveis.

Dona Silvania e Rafaela, meu agradecimento por toda ajuda, nos manejos do final de semana, e durante outros experimentos, por toda conversa boa e risada que tivemos e por toda ajuda oferecida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **9**
LISTA DE TABELAS **10**
LISTA DE ABREVIATURAS **11**
RESUMO **12**
ABSTRACT **13**
1. INTRODUÇÃO **14**
2. OBJETIVOS **16**
2.1 Objetivo geral 16
2.2 Objetivos específicos 16
3. REFERENCIAL TEÓRICO **17**
3.1 Panorama da avicultura de postura no Brasil 17
3.2 Minerais na nutrição de poedeiras 18
3.3 Cobre na nutrição de aves de postura 20
3.4 Absorção e metabolismo do cobre 23
3.5 Desenvolvimento da mucosa intestinal 26
4. MATERIAL E MÉTODOS **29**
4.1 Instalações e delineamento experimental 29
4.2 Eutanásia e coleta de material biológico 32
4.3 Processamento histológico 32
4.4 Morfologia intestinal 33
4.5 Estereologia 35
4.6 Análise estatística 35
5. RESULTADOS **36**
6. DISCUSSÃO **43**
7. CONCLUSÃO **51**
8. REFERÊNCIAS **52**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de absorção do cobre pela mucosa intestinal.....21

Figura 2. Ação das metalotioneínas na absorção do cobre pela mucosa intestinal.....21

Figura 3. Coloração e montagem das lâminas para leitura dos tecidos.....33

Figura 4. Fotomicrografia medidas nas vilosidades intestinais de pintainhas poedeiras.....34

Figura 5. Grid proposto para análise estereológica de estruturas anisotrópica.....35

Figura 6. Curva ajustada para regressão quadrática para a profundidade das criptas do duodeno.....38

Figura 7. Curva ajustada para regressão quadrática das variáveis histomorfometricas do jejuno.....39

Figura 8. Curva ajustada para regressão quadrática das variáveis histomorfometricas do íleo.....40

Figura 9. Frequência percentual (%) de vilos normais e vilos com perda de epitélio no duodeno.....41

Figura 10. Frequência percentual (%) de vilos normais e vilos com perda de epitélio do jejuno.....42

Figura 11. Frequência percentual (%) de vilos normais e vilos com perda de epitélio do íleo.....42

Figura 12. Frequência percentual (%) dos graus de perda de epitélio e exposição do conjuntivo do duodeno, jejuno e íleo de pintainhas.....43

Figura 13. Morfologia da mucosa do duodeno de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos.....48

Figura 14. Morfologia da mucosa do jejuno de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos.....49

Figura 15. Morfologia da mucosa ileal de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição calculada dos premixes mineral.....31

Tabela 2. Composição das dietas experimentais para pintainhas poedeiras.....31

Tabela 3. Variáveis histomorfometricas do duodeno, jejuno e íleo de pintainhas poedeiras com 35 dias alimentadas com cobre complexo aminoácidos.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

Zn – Zinco

Cu – Cobre

Mn – Manganês

Fe – Ferro

HMTBa – Ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanoico

AAFCO – Associação Oficial Americana de Controle de Alimentos

SOD1 – Superóxido dismutase I

Na – Sódio

CTR1 – Proteína transportadora de cobre

DMT1 – transportador de metais divalentes

ATOX1 – antioxidante 1

ATP7A – proteína ligante ao transporte do cobre

MT – metalotioneínas

Cu-CAA – Cobre complexado a aminoácidos

AL – Altura de vilo

LV – Largura de vilo

PC – Profundidade de cripta

LC – Largura de cripta

V:C – Relação altura de vilo e profundidade de cripta

Vv – Volume parcial da mucosa

PN – Porcentagem de vilos normais

PEC – Porcentagem de perda de epitélio e exposição do conjuntivo

AS – Área de superfície

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito da ingestão de níveis de cobre orgânico na forma de complexo-aminoácidos sobre as variáveis morfológicas dos segmentos intestinais de pintainhas de postura. Foram utilizadas 648 pintainhas da linhagem Dekalb White com um dia de idade, distribuídas em 6 tratamentos com 6 repetições e 18 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em níveis de inclusão de cobre complexado á aminoácidos (Cu-CAA) em: 0, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0 e 7,5 mg/kg, com inclusão de fitase em 600 FTU/kg. Aos 35 dias de idade, uma ave por UE foi selecionada para eutanásia. Os animais foram necropsiados e realizada a coleta do intestino delgado, sendo clivados, lavados e fixados em formol tamponado a 10%. O procedimento histológico compreendeu as fases de desidratação, clarificação, impregnação e, posterior emblocagem e microtomia com cortes de 5 µm de espessura. Após microtomia e disposição em lâmina, o material foi corado com coloração de rotina de hematoxilina e eosina. As avaliações quanto as variáveis morfológicas foram realizadas através de imagens digitalizadas com aumento de 4x para os cortes de duodeno e 10x para os demais cortes, sendo avaliados altura do vilo (AL), profundidade da cripta (PC), largura da cripta (LC), relação vilo:cripta (VC), área de superfície (AS), volume parcial da mucosa (Vv) e percentual de vilos normais e com perda de epitélio (PN e PEC, respectivamente). Os dados foram submetidos às premissas estatísticas e a análise de variância e, em caso de diferença significativa, as médias foram submetidas a estimativa de ingestão de cobre a partir de regressão polinomial. Os dados de PN e PEC foram avaliados pelo teste Qui-Quadrado. A histologia indicou que houve efeito dos níveis de inclusão de cobre orgânico sobre os segmentos intestinais. Na porção duodenal, houve efeito quadrático somente para a PC, indicando ponto máximo de 0,066 mg/ave/dia. No jejuno, a inclusão de cobre afetou significativamente ($p<0,05$) a AL, VC, AS e Vv, com efeito quadrático e estimativas de 0,083; 0,083; 0,078 e 0.079 mg/ave/dia de ingestão de Cu-CAA. Já no íleo, houve influência sobre a AL, PC, VC, AS e Vv, com estimativas de 0,074; 0,105; 0,041; 0,077 e 0,069 mg/ave/dia. A LC não apresentou efeito significativo para nenhum segmento intestinal. Para os as variáveis de PN e PEC, todos os segmentos intestinais apresentaram maiores valores de PEC do que PN, sendo observado alterações de Grau 3, principalmente nos tratamentos 0 e 7,5 mg/kg. De modo geral, o estudo revelou que a suplementação de Cu-CAA, influencia positivamente a mucosa intestinal de pintainhas, promovendo alterações na mucosa intestinal de pintainhas poedeiras e que rações isentas ou com níveis acima ao estudado podem promover danos ao epitélio, como perda de epitélio e de tecido conjuntivo, ocasionado pela desregulação do turnover celular da mucosa. Assim, níveis moderados de suplementação de cobre complexado a aminoácidos em 3,0 a 3,5 mg/kg são recomendados para otimizar o desenvolvimento e a saúde intestinal das pintainhas poedeiras, evitando danos ao epitélio e desregulação do turnover celular, objetivando uma melhor resposta absortiva dos nutrientes da dieta.

Palavras-chave: Complexo aminoácido, função intestinal, histologia, mineral

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of ingestion of organic copper levels in the form of amino acid complex on the morphological variables of the intestinal segments of laying hens. 648 Dekalb White chicks were distributed in six treatments with six replicates and 18 birds per experimental unit. The treatments consisted of inclusion levels of copper complexed with amino acids (Cu-CAA) at: 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 and 7.5 mg/kg, with inclusion of phytase at 600 FTU/kg. At 35 days of age, one bird per EU was selected for euthanasia. The animals were necropsied, and the small intestine was collected, cleaved, washed and fixed in 10% buffered formalin. The histological procedure included the following phases: dehydration, clarification, impregnation, and subsequent embedding and microtomy with 5 μm thick sections. After microtomy and placement on a slide, the material was stained with routine hematoxylin and eosin staining. Morphological variables were assessed using digital images at 4x magnification for duodenal sections and 10x for other sections. Villus height (VH), crypt depth (CD), crypt width (CW), villus:crypt ratio (VC), surface area (SA), partial mucosal volume (Vv), and percentage of normal villi and villi with epithelial loss (PN and PEC, respectively). Data were subjected to statistical assumptions and analysis of variance, and in case of significant differences, the means were subjected to estimation of copper intake using polynomial regression. PN and PEC data were assessed by the Chi-Square test. Histology indicated that there was an effect of the organic copper inclusion levels on the intestinal segments. In the duodenal portion, there was a quadratic effect only for CD, indicating a maximum point of 0.066 mg/bird/day. In the jejunum, copper inclusion significantly affected ($p<0.05$) VH, VC, SA and Vv, with a quadratic effect and estimates of 0.083; 0.083; 0.078 and 0.079 mg/bird/day of Cu-CAA intake. In the ileum, there was an influence on VH, CD, VC, SA and Vv, with estimates of 0.074; 0.105; 0.041; 0.077 and 0.069 mg/bird/day. CW did not show a significant effect for any intestinal segment. For the PN and PEC variables, all intestinal segments presented higher PEC values than PN, with Grade 3 alterations observed, mainly in the 0 and 7.5 mg/kg treatments. In general, the study revealed that Cu-CAA supplementation positively influences the intestinal mucosa of chicks, promoting alterations in the intestinal mucosa of laying hens and that diets free of it or with levels above those studied can cause damage to the epithelium, such as loss of epithelium and connective tissue, caused by dysregulation of mucosal cell turnover. Therefore, moderate levels of copper supplementation complexed with amino acids at 3.0 to 3.5 mg/kg are recommended to optimize the development and intestinal health of laying hens, avoiding damage to the epithelium and dysregulation of cell turnover, aiming at a better absorptive response to dietary nutrients.

Keywords: Amino acid complex, intestinal function, histology, mineral

1. INTRODUÇÃO

O ovo representa uma importante fonte nutricional para a população, por apresentar perfil de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais de alta qualidade, além de possuir fácil preparo, digestão e absorção. A produção de ovos ocorre mediante à criação de galinhas poedeiras, um dos segmentos da avicultura industrial, sendo o número de ovos produzidos reflexo do número de galinhas alojadas e por consequência, o número de pintainhas de postura que são eclodidas, criadas e recriadas.

Visando do aumento da produção de alimentos, como o ovo, se busca de forma sustentável ganhos na produtividade, evoluindo a partir dos estudos voltados a composições nutricionais das dietas para aves, pelo contínuo avanço genético e pelos fatores de criação e desafios no desenvolvimento e saúde das mesmas (Petek *et al*., 2010).

As primeiras semanas de uma galinha poedeira são cruciais para o seu desenvolvimento como uma boa produtora de ovos, já que este período, se caracteriza por intenso desenvolvimento fisiológico e grande demanda nutricional. Com a finalidade de dispor nutrição adequada para as aves, é indispensável a utilização de minerais (Sechinato; Albuquerque; Nakada, 2006). Os minerais estão presentes em várias concentrações no organismo animal e em todos os ingredientes utilizados nas formulações de rações, e podem ser caracterizados como macrominerais e microminerais, a depender da quantidade que são exigidos (Bertechini, 2021).

Dentre os microminerais essenciais, destaca-se o cobre, indispensável ao processo de ossificação, crescimento, formação do tecido conjuntivo, sistema imune, cofator enzimático, metabolismo energético e no transporte e absorção de ferro. Contudo, na formulação das dietas, são comumentemente utilizadas fontes inorgânicas desses nutrientes, sendo adicionadas em grande volume, como margem de segurança, implicando em prejuízos ao meio ambiente, devido a excreção do excedente não absorvido. Além dos problemas quanto a sustentabilidade, os minerais inorgânicos, são encontrados na sua forma iônica, que são facilmente complexados com outros componentes da dieta e podem apresentar relações de antagonismo com outros minerais, fazendo com que reduza a biodisponibilidade. Como forma de contornar esses obstáculos, se tem na indústria atualmente, os minerais complexados, que são fontes orgânicas, mais biodisponíveis para absorção pela mucosa intestinal, por utilizarem as vias de absorção das moléculas que as ligam (Goff, 2018).

Diversas pesquisam avaliam a eficácia da substituição das fontes inorgânicas por fontes orgânicas dos minerais, sobre o desempenho, qualidade de ovos e eficiência alimentar, contudo, há uma pequena quantidade de trabalhos avaliando o efeito do cobre de fontes orgânicas na nutrição de poedeiras, especialmente estudos direcionados aos efeitos do cobre sobre a

morfofisiologia da mucosa intestinal. Logo, a partir disso, hipotetiza-se que o cobre complexado a aminoácidos pode promover melhorias no desenvolvimento da mucosa intestinal e nas características morfológicas de pintainhas. Considerando as propriedades bioquímicas e estruturais do cobre nos processos metabólicos, é plausível que sua presença na forma de complexo aminoácido permita otimizar sua absorção e biodisponibilidade, que consequentemente possa resultar em melhorias no desenvolvimento da estrutura e função intestinal, promovendo absorção mais eficiente de nutrientes, fazendo com que seja possível a produção de uma pintainha bem desenvolvida e consequentemente uma futura poedeira produtiva.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de níveis de suplementação do cobre orgânico, na forma de complexo metal aminoácido sobre os parâmetros biométricos e morfológicos do duodeno, jejuno e íleo de poedeiras em fase de cria.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de níveis de suplementação do cobre complexado a aminoácidos sobre a altura do vilo, profundidade da cripta, largura da cripta, relação vilo:cripta, área de superfície da mucosa, volume parcial e de integridade da mucosa intestinal

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Panorama da avicultura de postura no Brasil

O segmento industrial da produção de aves no Brasil e no Mundo é conhecido como avicultura moderna, devido a construção ao longo das décadas do modelo mais tecnificado de gerenciamento produtivo e econômico, impulsionado pelas pesquisas cientificas em genética, nutrição, ambiência e manejo, para obter assim um sistema de larga escala, que permita a produção de proteína animal de alto valor biológico que atenda as condições dos mercados consumidores.

Diante deste ponto de vista, os ovos de galinha são uma fonte acessível e nutritiva, com alto valor biológico e que desempenha importante papel nesse contexto. O ovo apresenta duas finalidades na avicultura, a incubação (compreendendo a produção a partir de matrizes e gerando descendentes de linhagens comerciais para produção de ovos e carne) e de consumo, comumente denominados “ovos de mesa”. O ovo é um alimento natural, menos oneroso comparado a outras fontes proteicas, e apresenta excelente qualidade nutricional e reduzido teor calórico. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, em 2022, a produção mundial de ovos de mesa atingiu 93 milhões de toneladas, representando aumento de 2,30% em relação ao ano anterior, assim como aumento de 1,94% no consumo mundial em relação a 2021, isto devido a maior inclusão no mercado, baixos índices de restrições nutricionais ao ovo e a mudança da dieta da população (FAO, 2022).

Atualmente, o Brasil ocupa a quinta posição entre os maiores produtores de ovos do mundo, com o alojamento comercial de galinhas de postura de aproximadamente 131 milhões de animais, resultando em uma produção de 53 bilhões de ovos, sendo 99% de toda a produção destinada ao abastecimento do mercado interno, em 2023. O aumento das taxas de exportações brasileiras de ovos (considerando produtos *in natura* e processados), em 2023, atingiu a marca de 1%, com incremento de 0,56% em relação ao ano anterior, sendo reflexo da atual conjuntura mundial, pelo impacto causado e que segue causando pela disseminação da Influenza Aviária em vários países, assolando as plantas produtivas, o que favoreceu a presença do Brasil no mercado internacional ao longo do último ano (ABPA, 2024).

Em relação ao consumo de ovos, 2023 encerra com o consumo de 242 unidades/hab/ano, apenas um ovo a mais ao contabilizado em 2022, contudo, ainda é inferior ao recorde já registrado para o Brasil, que chegou ao consumo de 257 ovos/per capita no ano de 2021 (ABPA, 2024). Este impulso no consumo do ovo, nos últimos anos, vem mediante a mudança dos hábitos alimentares, a versatilidade do produto e do aumento do preço de outras proteínas,

contudo o consumo ainda é baixo, quando comparado a outros países, como Japão, Colômbia, Mexico e Argentina (Capia, 2024).

Quanto aos estados nordestinos, em sua maior parte, ocorreu grande ampliação da produção de ovos, impulsionando sua contribuição ao mercado nacional, registrado em 2022 em 17,58% na produção de ovos e 15,97% no alojamento de poedeiras. Em 2023, Pernambuco foi a quarta maior unidade federativa no alojamento de pintainhas de postura, com aproximadamente 7,89%, atrás apenas do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, com 28,85% (ABPA, 2024). O alojamento de pintainhas de postura e a quantidade de poedeiras comerciais são intimamente relacionados, uma vez que, as pintainhas alojadas, com boa nutrição, ambiência, genética e manejo, serão as futuras produtoras, que abastecerão o mercado consumidor. Com isso, para que seja possível a busca por animais produtivos e eficientes na fase de produção, as fases iniciais têm sua importância reforçada entre os diversos aspectos ligados a criação de poedeiras, principalmente a nutrição, sendo necessário o fornecimento balanceado e adequado de nutrientes.

3.2 Minerais na nutrição de poedeiras

Os minerais são classificados de acordo com a sua concentração nos tecidos do organismo, em macro e microminerais e estão envolvidos em elevado número de rotas metabólicas e fisiológicas. Os macrominerais são aqueles exigidos em maior quantidade nutricional (acima de 100 mg), como o cálcio e o fósforo, e estão relacionados com funções estruturais e fisiológicas. Já os microminerais ou minerais traço, são aqueles exigidos abaixo de 100 mg, como o zinco, manganês, cobre e ferro, e desempenham normalmente funções metabólicas, na resposta imune, como cofatores enzimáticos, reguladores hormonais e no desenvolvimento e crescimento animal, e são mais difíceis em sua determinação devido sua baixa concentração nos tecidos e pelas limitações de técnicas analíticas (Bao *et al*., 2010b; Bertechini, 2021).

A utilização metabólica dos microminerais é dependente principalmente da sua absorção através da alimentação, que podem ser encontradas em diversos arranjos e formas químicas e que podem sofrer com as condições físico-químicas e estruturais do sistema digestivo das aves e, consequentemente, podendo não serem absorvidos. As fontes de microminerais comumentemente utilizadas na fabricação de rações, são aquelas tidas como inorgânicas, na forma de cloretos, óxidos, sulfatos e carbonatos. As fontes inorgânicas são consideradas menos biodisponíveis que as fontes orgânicas, já que são mais suscetíveis a fatores da dieta, como antagonismo e sinergismo com outros minerais, fatores antinutricionais, tipo de ligação,

quantidade ingerida, formação de complexos insolúveis, além do fator biológico do animal. Com isso, os microminerais de fontes inorgânicas são suplementados com grandes margens de segurança, a fim de se evitar deficiências clínicas, e, consequentemente, o teor de minerais excretados é maior, gerando preocupações sobre os potenciais danos ambientais causados pela contaminação dos solos e lençóis freáticos, fazendo-se com que muita atenção se tenha voltado à melhoria da disponibilidade e aproveitamento total desses nutrientes. Assim, pesquisas relacionadas ao uso de fontes orgânicas têm se expandido na área de nutrição de animais não ruminantes (Mabe, 2001; Zafar; Fatima, 2018).

A Associação Oficial Americana de Controle de Alimentos (AAFCO, 2023), classifica e define os minerais orgânicos em:

a) Complexo metal aminoácido: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácido(s), sendo declarado o metal (Exemplo: manganês complexado à aminoácidos).
b) Complexo metal aminoácido específico: é o produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácido específico, sendo declarado ambos os componentes (Exemplo: complexo cobre-lisina).
c) Quelato metal aminoácido: é o produto resultante da quelação de um sal metálico solúvel com aminoácidos, com um mol metálico para um a três moles de aminoácidos, para formar ligações covalentes coordenadas.
d) Quelato metal-MHA: quando ocorre a ligação de um sal metálico com ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanoico (HMTBa), gerando um quelato de um mol de íon metálico para dois moles de HMTBa, formando uma ligação covalente.
e) Complexo metal polissacarídeo: é resultante da complexação de um sal solúvel com uma solução de polissacarídeos. Formando uma molécula de ligação química fraca e os minerais ficam envolvidos na matriz do polissacarídeo promovendo proteção física contra a degradação no lúmen intestinal.
f) Metal proteinato: é o produto resultante da quelação de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteína parcialmente hidrolisada.

As definições dos minerais orgânicos citados, veem sendo adotadas desde 1990, contudo com o passar dos anos, a AAFCO, traz em suas publicações oficiais novas propostas e revisões dos termos. O incremento das pesquisas com tais fontes minerais, é resultante dos benefícios propostos por eles, como a maior biodisponibilidade por serem captados pelos carreadores das moléculas orgânicas as quais se ligam, redução da competitividade com outros minerais e

antagonistas dietéticos, como o ácido fítico e oxalatos e por serem mais estáveis ao pH do trato gastrointestinal (Byrne; Murphy, 2022). Devido sua possibilidade acentuada de elevar a disponibilidade dos minerais no organismo animal, diversos experimentos são conduzidos a fim de descrever a biodisponibilidade e benefícios do uso de "minerais orgânicos". Em estudo utilizando células Caco-2 como modelo experimental para avaliação da absorção do cobre, pesquisadores verificaram que os aminoácidos facilitam o transporte do cobre, quando complexados ao íon metálico, partindo-se do pressuposto que a absorção ocorre pelos transportadores dos aminoácidos (Gao *et al*., 2014). Sauer *et al*. (2017) utilizando o mesmo modelo celular, observaram que as fontes de zinco complexado a aminoácidos se sobressaem às fontes inorgânicas, aumentando a disponibilidade de Zn. Além disso, os pesquisadores concluíram também que as fontes orgânicas descritas, não foram afetadas pela presença de altos níveis de ácido fítico, já que nos estudos de Lonnerdal *et al*. (1988) demonstram que a absorção mineral é inversamente correlacionada com a concentração de fitato na dieta, formando complexos insolúveis.

Gheisari *et al*. (2011) comparando a suplementação de diferentes níveis de manganês, zinco e cobre de fonte inorgânica e orgânica, na produção e qualidade de ovos de poedeiras, concluíram que, em níveis de suplementação menores que as fontes inorgânicas, as fontes orgânicas melhoraram o desempenho da produção e a qualidade dos ovos. Assim como, Li *et al*. (2019) trabalhando com Zn sulfato e Zn metionina, concluíram que a utilização de Zn metionina em 80 mg kg^{-1} reduz o consumo médio diário de ração e melhora a conversão alimentar, com efeito significativo para aumento do peso do ovo, altura de albúmen e unidade Haugh.

3.3 Cobre na nutrição de aves de postura

Os minerais são vitais para todas as funções metabólicas e bioquímicas do organismo animal, e dentre os microminerais, o cobre (Cu) é um dos citados como essencial na nutrição, promovendo o crescimento normal, bom funcionamento do sistema nervoso, cofator enzimático, assim como atuação na regulação do sistema imunológico e circulatório (Suttle, 2010). Sua essencialidade foi registrada pela primeira vez a partir dos estudos de Hart e Elvehgjem (1928) em experimentos com ratos, onde puderam verificar importância para o crescimento e formação da hemoglobina a partir de distúrbios clínicos como a anemia. Além disto, a teoria foi comprovada por McHargue, em 1926, em suas pesquisas utilizando dietas purificadas para ratos de laboratório.

Como um micronutriente necessário, o cobre demonstra sua importância a partir das funções metabólicas e estruturais, como cofator enzimático, indispensável para o funcionamento de enzimas como a citocromo c-oxidase, superóxido dismutase I (SODI), lisil-oxidase, ceruloplasmina e ferroxidase II (Hashimoto; Kambe, 2015).

A citocromo c-oxidase é o último complexo proteico da cadeia transportadora de elétrons, proteína da membrana mitocondrial, responsável por parte do processo de respiração celular, catalisando a redução do oxigênio molecular em água e formando a adenosina trifosfato (ATP). A enzima apresenta em sua composição para o bom funcionamento três átomos de cobre e atua principalmente no fígado, cérebro e coração (Leary *et al*., 2013).

A superóxido dismutase I faz parte do complexo enzimático antioxidante do organismo das aves, atuando na defesa intracelular e extracelular sobre os radicais livres do organismo, que capturam os elétrons através do processo de redução e podem causar danos celulares ao organismo. Presente principalmente no fígado, o Cu é o elemento traço que atribui a capacidade catalítica à enzima e sem a presença do mineral, a atividade enzimática é comprometida. A SOD1 é uma enzima cuprodependente e zinco-dependente, logo se perfazendo necessária a presença de Cu e Zn para que a enzima exerça a sua função. Com isso, em estudos com frango de corte, Azad *et al*. (2017), verificando a atividade enzimática da SOD1 sobre o nível de suplementação de Zn e a fonte mineral, observaram maior atividade hepática e plasmática quando os níveis foram de 50 mg/kg independente da fonte mineral, contudo, foi maior quando utilizado zinco de fonte orgânica (Zn-Metionina), que proporcionou aumento na atividade da SOD1 a nível de pancreático. Também foi constatado uma supressão da atividade da SOD1 nas aves alimentadas com alto teor de suplementação de Zn (80 mg/kg), sendo justificado por haver uma diminuição da disponibilidade do íon de cobre, devido ao aumento da metalotioneína no fígado e pâncreas, se ligando ao cobre nesses tecidos.

A lisil oxidase é uma amina oxidase cobre-dependente que utiliza a lisina existente na matriz extracelular, colágeno e elastina para a síntese de matrizes de tecido conjuntivo principalmente nos ossos das poedeiras (Lucero; Kagan, 2006). Segundo Berwanger *et al*. (2018), em poedeiras na fase de produção, a lisil oxidase possui alta atividade na região do istmo no oviduto, contribuindo para a formação das membranas interna e externa dos ovos, já que são constituídos por colágeno e proteínas. Medeiros (2016) relata também que, quando há uma deficiência nos níveis de Cu, pode ocorrer diminuição da atividade da enzima e essa redução resulta em menor resistência à torção na tíbia de pintos de corte (Opsahl *et al*., 1982).

Um importante marcador do teor de cobre no organismo é a ceruloplasmina, enzima oxidase sintetizada no fígado e secretada para o plasma sanguíneo, representando cerca de 95%

do cobre encontrado no plasma de animais vertebrados, por conter aproximadamente sete íons de cobre ligados à sua estrutura, aos quais podem ser transferidos para os tecidos (Roberts, 2012). Este complexo enzimático atua principalmente como transportador de cobre até órgãos como coração, cérebro e ossos, para ser incorporado a outras enzimas cobre-dependentes que atuam no sistema antioxidante e no metabolismo do ferro (Fe). Também chamada de ferroxidase I, a ceruloplasmina converte o íon Fe^{2+} da ferritina em íon Fe^{3+} da transferrina, com auxílio da ferroxidase II (Harris *et al*., 1995). Além da ceruloplasmina, outra ferroxidase dependente de Cu é essencial no metabolismo do ferro, a hefaestina, responsável pelo transporte basolateral de Fe nos enterócitos duodenais (Kuo *et al*., 2004).

Deste modo, o cobre está presente em metaloenzimas que fazem parte da respiração celular, ação antioxidante, neurotransmissão, síntese de tecidos e em outros processos metabólicos, como o metabolismo do ferro. Não só apenas em sistemas enzimáticos, muitas outras funções do Cu se destacam, tais como importante agente de pigmentação das plumas e penas, desenvolvimento e crescimento ósseo e na formação de hemoglobina (Gattás; Barbosa, 2004). É crucial ressaltar que o cobre é utilizado como substituto a antibióticos e promotores de crescimento para frangos de corte e suínos. Xia, Hu e Xu (2005) avaliando a adição de cobre inorgânico, observaram redução da contagem de bactérias *E. coli* e *Clostridium* spp, além de exercer função estimulante sobre bactérias benéficas no organismo de suínos e frangos, sendo destacado pelos autores, o impacto positivo sobre os leitões em fase de transição entre a maternidade e a creche.

Na deficiência do cobre, as principais manifestações clínicas incluem anemia, redução do volume corpuscular, redução da concentração de hemoglobina, diarreia, desordens ósseas, alterações nervosas e cardiovasculares, falhas reprodutivas e perda de pigmentação. Em aves é possível observar também, hipertrofia do coração, deformidades e redução da resistência óssea e maior incidência de ovos sem casca ou com formato e textura anormais. A deficiência de cobre pode ser causada, também, como resultado de altos níveis de antagonistas desse elemento na dieta, como o zinco, devido a competições pelo sítio de ligação para absorção (Mcdowell, 1992).

A suplementação excessiva de cobre ocasiona desordens fisiológicas e metabólicas. É possível observar na literatura que em aves alimentadas com dietas com elevados níveis de cobre, ocorreu redução do consumo de ração e na produção de ovos, constatando que níveis acima de 1000 ppm, ocasionam a interrupção completa da postura, depressão do consumo, redução do volume lipídico no sangue e fígado. Logo, tanto a deficiência, quanto o excesso

deste mineral, pode gerar consequências irrefutáveis no desenvolvimento das aves e no sistema de produção (Jackson, 1977; Gilbert; Sander; Brown, 1996).

3.4 Absorção e metabolismo do cobre

O cobre fornecido na dieta dos animais, se encontra na maioria das vezes na forma cúprica (Cu^{2+}), contudo, apenas íons na forma cuprosa (Cu^{+}) são absorvidos. A absorção do cobre é realizada em vários locais do trato gastrointestinal, em ruminantes por exemplo, o local de absorção é no duodeno e jejuno, já em suínos pode ocorrer no estômago e no duodeno. Nas aves, a absorção do cobre pode ocorrer no proventriculo, mas seu principal centro absortivo é o intestino delgado, o pH no proventriculo auxilia no processo de solubilização dos íons, facilitando no processo de absorção (Bao *et al*., 2010a).

A absorção do Cu no organismo se dá por difusão paracelular, devido à diferença de potencial elétrico através das junções estreitas dos enterócitos, criada pelo teor de sódio (Na^{+}) do espaço intersticial, contribuindo para essa absorção. O Cu^{2+} solubilizado no proventriculo, ao chegar na borda da escova e com ação das metaloredutases, é reduzindo a Cu^{+} (Arredondo; Núñez, 2005).

Após o processo de redução do íon, o Cu^{+} se liga a proteína transportadora de cobre (CTR1) na membrana apical do enterócito ao qual consegue atravessar a membrana, contudo, apesar da maior especificidade do Cu pelo transportador CTR1, a absorção desse nutriente pode ocorrer por outros transportadores não específicos, como o transportador de metais divalentes (DMT1), sendo utilizado de forma secundária por possuir baixa afinidade ao cobre e ocasionalmente aumentar o antagonismo com outros minerais, como Zn e Fe (Prohaska, 2008). Uma vez que o cobre se encontra no citoplasma, este elemento na forma livre, se apresenta com potencial risco celular, podendo causar danos oxidativos. Como forma de proteção da célula intestinal, o cobre intracelular se liga a proteínas especializadas que atuam levando o cobre para enzimas e organelas específicas, as metalochaperonas, como a antioxidante 1 (ATOX1). A proteína chaperona se liga ao Cu^{+} e o transporta através do citosol celular até o complexo de Golgi, onde o cobre será realocado para outro transportador, a ATP7A, durante o processo de direcionamento, a ATOX1 pode fornecer íons de Cu^{+} para enzimas, como a superóxido dismutase e a hefaestina. ATP7A é conhecida como proteína de Menkes, sendo uma ATPase transmembrana que utiliza a energia da hidrolise do ATP para o transporte de Cu, sendo sua maior expressão no intestino e transporta seis moléculas de cobre (Tümer; Møller; Horn, 1999).

A ATP7A é incorporada a uma membrana de uma vesícula no complexo e translocada até a membrana basolateral, ambas as membranas se fundem. A proteína ligante ao transporte

do cobre (ATP7A), possui em sua composição, oxidases, que atuam na oxidação do Cu^{+}, formando novamente Cu^{2+} para que seja liberado das células intestinais à corrente sanguínea, via circulação portal (Figura 1). Na circulação, o cobre difundido é ligado principalmente à albumina ou a transcuprina, mas também pode ser encontrado ligado em aminoácidos, como a histidina, sendo transportados até o fígado (Goff, 2018).

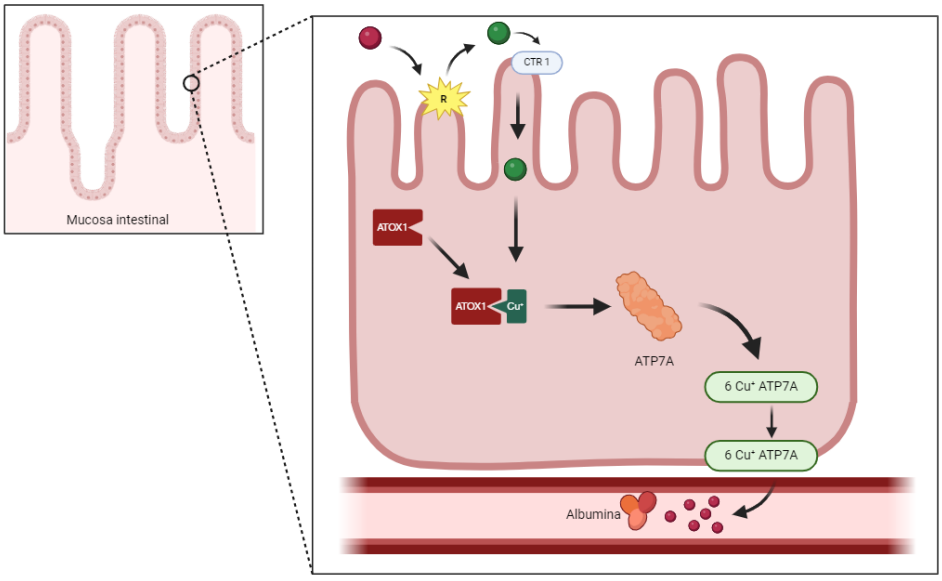

Figura 1. Mecanismo de absorção do cobre pela mucosa intestinal. Cu^{2+} (círculo vermelho), Cu^{+} (círculo verde), metaloredutases (R). (Fonte: Adaptado de Goff, 2018).

Em situação de níveis adequados de cobre e de reserva do íon, os enterócitos começam a produção de metalotioneínas (MT), que capturam os íons de Cu^{+}, ficando retido no enterócito, sendo liberado lentamente no citosol para que a ATOX1 realize o transporte. Esse processo, é importante para evitar a possível oxidação da célula intestinal e consequente perda (Figura 2).

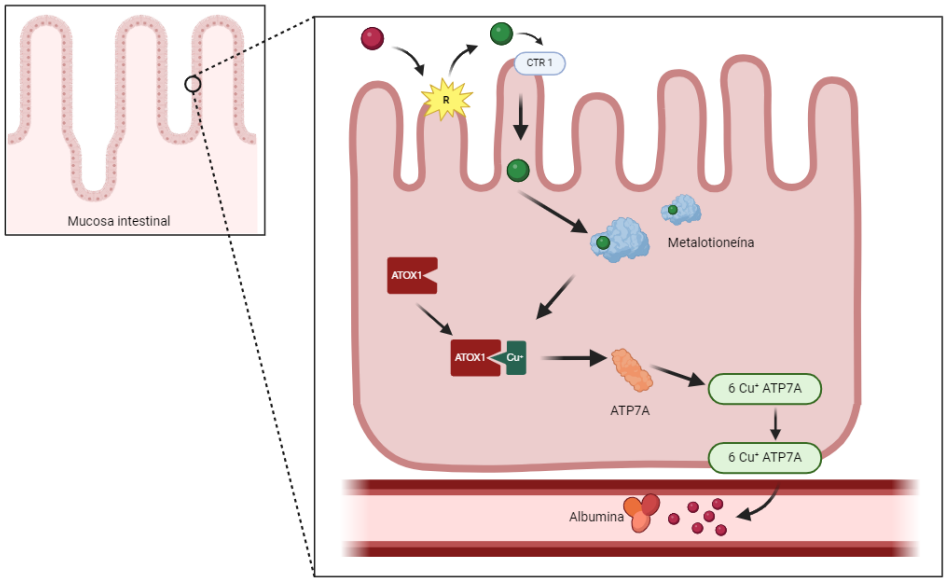

Figura 2. Ação das metalotioneínas na absorção do cobre pela mucosa intestinal. Cu^{2+} (círculo vermelho), Cu^{+} (círculo verde), metaloredutases (R). (Fonte: Adaptado de Goff, 2018).

A maior parte do Cu na circulação, é captado pelos hepatócitos que novamente com o maquinário da Cu redutase, converte o Cu^{2+} em Cu^{+} que é absorvido pelo CTR1 através das membranas dos hepatócitos. O cobre hepático é a principal forma de utilização para formação de diversas enzimas, como a superóxido dismutase 1 e citocromo c-oxidase. Além disso, no fígado ocorre a formação de proteínas e aminoácidos, como por exemplo a ceruloplasmina (Pal *et al*., 2010). Para exportação de íons de Cu para outros tecidos, ocorre processo semelhante ao que ocorre nos enterócitos, sendo através da ação das metalochaperonas movendo o Cu para a transmembrana do complexo de Golgi dos hepatócitos, onde será transportado pela ATPase (ATP7B) (Linder, 2016). O fígado é o órgão responsável pela homeostase do cobre no organismo, local onde o mineral pode permanecer armazenado quando absorvido em grandes quantidades, permanecendo ligado a metalotioneina e as metalochaperonas. O excesso é eliminado pelo polo canalicular do hepatócito, sendo posteriormente excretado na bile, não sendo reabsorvida pelo epitélio intestinal das aves e diretamente eliminado nas fezes (Goff, 2018).

Esse processo de absorção e metabolismo é descrito como altamente eficiente, no qual cerca de 40 a 60% do cobre solúvel livre da dieta consegue atravessar a membrana apical das células do estômago e do epitélio intestinal. Contudo, as interações metabólicas entre os minerais e outros compostos são muito frequentes e, consequentemente, podem sofrer com fatores que interferem no processo de absorção. A formação de complexos insolúveis, competição dos íons pelas mesmas vias metabólicas, complexação dos íons por agentes ligantes e competição pelo mesmo sítio de ligação, são apenas alguns dos fatores descritos por Suttle (2010). Um exemplo desses efeitos, é o antagonismo entre o Cu e o Fe, pois ambos os íons competem por sítios de ligação a partir da mucosa intestinal, principalmente o CTR1 e DMT1. Associado a isto, temos o ácido ascórbico, que indiretamente, promove maior mobilização e absorção do Fe, convertendo-o para sua forma férrica, aumentando sua concentração na corrente sanguínea e, consequentemente, no fígado, fazendo com que a absorção do Cu seja reduzida, acarretando anemia devido aos baixos níveis de cobre, não formando a ceruloplasmina. O fornecimento desbalanceado desses minerais ou de forma excessiva, pode ocasionar problemas na redução da biodisponibilidade, gerando sintomas de deficiência. É observado que dietas ricas em ferro acarretam o desenvolvimento de anemia por deficiência de cobre, acompanhando assim diversas alterações sistêmicas. Ha, Doguer e Collins (2017) estudando a absorção *in vivo*, demonstraram que a carga de ferro perturba a regulação homeostática da absorção do cobre dietético e prejudica a distribuição do cobre nos diferentes tecidos de ratos de camundongos.

Outro elemento mineral que apresenta efeitos antagônicos com o Cu é o Zinco (Zn). O Zn é o micromineral ativador primário da metalotioneina nos enterócitos, que se liga aos íons livres de Zn no citosol celular e, posteriormente, sequestra os íons livres de Cu. Contudo, quanto maior a suplementação de Zn na dieta, mais acentuada é a produção da enzima ligante, resultando na não seleção do sequestro e ocasionando maior sequestro do Cu absorvido, devido à maior afinidade por esse mineral (Goff, 2018; Su *et al*., 2018).

Como solução para reduzir o antagonismo mineral e possíveis alterações na absorção do cobre, se dá a utilização do cobre complexado a aminoácidos, fazendo com que o mineral seja captado e absorvido na mucosa intestinal pelos transportadores dos aminoácidos.

3.5 Desenvolvimento da mucosa intestinal

Com o avanço tecnológico da genética, a cada nova geração formada, as poedeiras são desenvolvidas para serem mais precoces, produtivas, consumirem menos alimento e, consequentemente, produzirem mais ovos e, portanto, serem descartadas tardiamente, com idades em torno de 90 a 100 semanas. A busca pela maior permanência na postura e pelo melhor desempenho na fase de produção, exige bom desenvolvimento da franga nos períodos de cria e recria, sendo caracterizadas como as fases de crescimento e desenvolvimento, um processo descontínuo e multifásico (Lara; Amaral; Triginelli, 2019).

A fase de cria é definida pelas cinco semanas iniciais, ao qual ocorre a primeira onda de crescimento, caracterizada principalmente pelo desenvolvimento dos órgãos do sistema esquelético, digestório e imunológico. Posteriormente, a fase de recria, é marcada pelo evento fisiológico de maior importância para a poedeira, o desenvolvimento do sistema reprodutor, dando continuidade na fase de pré-postura. Assim as aves com deficiências no desenvolvimento corporal durante as fases iniciais resultam em poedeiras menos produtivas e que produzem ovos de menor tamanho (Krás *et al*., 2013).

As fases iniciais são marcadas por alta sensibilidade a fatores estressantes, como o transporte, recebimento, alojamento e manejo, ocasionando maior suscetibilidade a doenças. As pintainhas dependem do sistema imune inato como linha de defesa imunológica nos primeiros dias de vida, além dos anticorpos maternos que são depositados no ovo, durante a sua formação. A resposta imune inata consiste em respostas celulares por macrófagos, células dendríticas, heterófilos e células *natural killers* associadas no organismo desde a fase de incubação. Com a eclosão, as pintainhas são vacinadas, e por sua vez, estimula a resposta imune específica, através da produção de anticorpos e compostos anti-inflamatórios (Lamot, 2017).

O cobre participa de importantes rotas na inibição da inflamação, a partir da síntese de prostaglandinas e na conversão do ácido araquidônico, sendo utilizado como alternativa aos antibióticos que afetam o desenvolvimento do desempenho de frangos e poedeiras, já que ocasionam alterações metabólicas como o estresse imunológico (Scott *et al*., 2018). Contudo, para que o Cu atue no organismo dos animais, participando de diversos processos enzimáticos, para produção e mantença, este elemento precisa ser absorvido, através do trato gastrointestinal.

A formação do trato gastrointestinal tem início após as primeiras 24 horas de incubação. No quinto dia de vida embrionária, ocorre a diferenciação das cavidades orais e gástricas, e início da formação do proventrículo e moela. Ao 14º dia de embrião, inicia a introdução do intestino na cavidade abdominal juntamente com a gema, que permanecera internalizada após a eclosão, servindo de fonte nutricional ao pintinho. A taxa de crescimento do intestino delgado é superior ao dos demais órgãos do organismo animal, podendo chegar a 3,5% do peso do embrião aos 18 dias de incubação, contudo, diversos fatores podem influenciar o seu desenvolvimento (Uni *et al*., 2003). Neste momento, as vilosidades intestinais podem ser divididas em duas principais fases, vilosidades maiores (apresentando formatos digitiformes) e vilosidades menores (são curtas, estreitas e com formato pontiagudo), sendo, a partir do décimo nono dia de incubação, as vilosidades passam por uma nova fase de desenvolvimento, que incluem a diferenciação dos enterócitos e a definição das criptas, mediante a absorção do fluido amniótico, gema e pelas mudanças hormonais (cortisol, hormônios tiroidianos e fatores de crescimento). Ozaydin e Celik (2012) consideram que essas mudanças celulares que ocorrem na fase final de incubação, é a transição adaptativa a nutrição exógena. Aos 21 dias de incubação ocorre o aumento no número de células caliciformes ao longo das vilosidades, em todos os segmentos do intestino delgado aos quais passam a produzir mucinas; a partir deste estágio, o intestino atua como sistema imunológico secundário, com a produção da mucina ácida, que funcionam como muco protetor contra patógenos no intestino (Uni *et al*., 2000, 2003).

Na eclosão, o sistema digestório está anatomicamente completo, porém sua capacidade funcional não permite ainda adequada digestão e absorção de todos os nutrientes (Maiorka *et al*., 2004), sendo formado por um tubo oco, fibromusculoso, constituído por túnicas concêntricas, denominadas de mucosa, submucosa, muscular e serosa, e o seu desenvolvimento está sob a dependência de fatores nutricionais, ambientais e fisiológicos.

Morfologicamente o intestino delgado é segmentado em duodeno, jejuno e íleo, e apresenta em sua mucosa as vilosidades e as criptas. Os vilos são estruturas revestidas por epitélio simples, constituído por células caliciformes, epiteliais e enteroendócrinas. As células caliciformes, como retratado anteriormente, produzem muco que atuam no sistema imune, mas

também protege o epitélio intestinal da ação das enzimas digestivas, principalmente na região do duodeno, devido atividade do pâncreas. As células epiteliais ou enterócitos, atuam como responsáveis pela digestão a nível de membrana, funcionando como uma barreira para absorção das moléculas e atuam na secreção enzimática. Por fim, as células enteroendócrinas são responsáveis pela secreção de hormônios peptídicos que regulam a digestão e absorção (Boleli; Maiorka; Macari, 2002; Maiorka *et al*., 2004). As criptas de Lieberkuhn são estruturas tubulares, simples, formadas por invaginações do epitélio entre as bases das vilosidades adjacentes, e são responsáveis pela proliferação celular e pela renovação celular das vilosidades.

A manutenção e o desenvolvimento da mucosa intestinal ocorrem durante toda a vida do animal, através de eventos citológicos e maquinários fisiológicos eficientes, ocorrendo por processos de perda e renovação celular. Esses eventos são constantes e responsáveis pela manutenção do tamanho e do número de vilosidades, o que mantém a capacidade digestiva e absortiva do intestino (Boleli; Maiorka; Macari, 2002). O desenvolvimento e a integridade da mucosa intestinal podem ser mensurados pelo aumento da altura dos vilos, profundidade das criptas e pelas suas relações.

Já se é sabido que, além dos fatores fisiológicos naturais do intestino, os nutrientes dietéticos, a forma física do alimento e até mesmo os fatores antinutricionais presentes nos ingredientes atuam sobre os aspectos morfológicos da mucosa intestinal, como altura das vilosidades, profundidades das criptas, área de absorção e suas relações (Sagher *et al*., 1991; Jin *et al*., 1994). As variáveis morfológicas do intestino permitem avaliar a dinâmica da homeostase celular da mucosa, sendo possível observar aumento ou redução na proliferação celular, na taxa de extrusão das células epiteliais, atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, sendo assim relacionado a redução da capacidade digestiva e absortiva da mucosa intestinal (Pluske *et al*., 1997).

Ainda se tratando do sistema digestório, o pâncreas e o fígado se apresentam como glândulas anexas no sistema e são órgãos coadjuvantes na digestão, absorção e metabolismo dos nutrientes. O pâncreas, está localizado entre as alças duodenais e é responsável pela produção endócrina de insulina e glucagon e função exócrina, com a produção de enzimas pancreáticas que atuam na digestão dos nutrientes. Assim como em mamíferos domésticos, nos frangos de corte e galinhas poedeiras, o fígado é considerado o centro metabólico do organismo, envolvido em uma série de funções anabólicas, catabólicas e homeostáticas, responsável pela maior parte dos processos de síntese, excreção e desintoxicação. Desempenha importante papel a digestão, metabolismo e armazenamento de nutrientes, como por exemplo, na produção de bile para a digestão de lipídeos, uma vez que o conteúdo biliar é desemborcado na alça

descendente do duodeno, a partir da vesícula biliar, próximo aos ductos pancreáticos. Em poedeiras, o fígado é responsável pela síntese das matérias primas para a formação da gema, no ovário (Lucas; Denington, 1956; Zaefarian *et al*., 2019).

As atividades conjuntas dos órgãos do sistema digestório, mediante o consumo de alimentos, promovem modificações no organismo, como relatado por Uni, Noy e Sklan (1995), que observaram aumento na secreção das enzimas pancreáticas, possivelmente em resposta ao aumento dos nutrientes no intestino delgado. Esse aumento da digestão, proporcionou maior disponibilidade de nutrientes passíveis a serem absorvidos e, consequentemente, estímulo para o desenvolvimento da mucosa intestinal, como fator adaptativo para aumento da área absortiva. As alterações morfológicas na mucosa intestinal estão diretamente relacionadas com o aproveitamento da dieta e ocasionalmente causa efeito sobre o desempenho produtivo dos animais (Rostagno, 2020).

Silva (2020) estudando fontes de microminerais sobre a histologia intestinal de poedeiras com 78 semanas de idade, observou que os animais que consumiram as dietas com suplementação de minerais orgânicos apresentaram resultados superiores de altura de vilo e profundidade de cripta comparados a aqueles alimentados com minerais de fonte inorgânica. El-Sharawy *et al*. (2022) estudando diferentes níveis de cobre em bagres listrados, demonstraram que o fígado apresentou efeito linear no acúmulo de cobre, para os níveis utilizados, além de observarem formação regular do epitélio intestinal e maiores vilosidades, sendo indicativo de melhoria da saúde intestinal resultante da alta capacidade de digestão e da imunidade intestinal ativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob o protocolo nº 6000110221.

4.1 Instalações e delineamento experimental

Um total de 648 pintainhas de postura da linhagem Dekalb White com um dia de vida e peso médio de 37,93±0,10 g, foram distribuídas em 36 gaiolas de arame galvanizados com pintura eletrostática, equipadas com comedouro tipo calha e bebedouro automático tipo copo. As gaiolas experimentais possuíam dimensões de 50 cm de largura, 50 cm de comprimento e 80 cm de altura, proporcionando uma densidade de alojamento de 222 cm²/ave, respeitando o recomendado pelo manual da linhagem. O período experimental compreendeu a fase de cria,

de 1 a 35 dias de idade e durante todo o período o fornecimento de água para os animais foi *ad libitum*, enquanto o consumo de ração foi ajustado semanalmente conforme a necessidade nutricional.

As aves foram vacinadas ainda no incubatório contra a doença de Newcastle, doença de Marek e doença de Gumboro, e durante o período de criação foram submetidas a vacinação e doses de reforço contra os principais desafios sanitários (bronquite infecciosa das galinhas, doença de Newcastle, pneumovírose, bouba aviária, encefalomielite aviária e coriza infecciosa das galinhas). O programa de luz adotado foi o recomendado pelo manual da linhagem, sendo na primeira semana de vida as aves foram submetidas a 23 horas de luz, para adaptação as instalações e como estímulo ao consumo de ração e água, reduzindo posteriormente uma hora diária até permanecerem com luz natural de 12 horas. As médias de temperatura e umidade relativa foram registradas com Dataloggers (HOBO U12-012) e termo-higrômetros digitais (Incoterm), no interior do galpão experimental, sendo: 32,4ºC e 60,99% na primeira semana; 29,9ºC e 66,12% na segunda semana; 29,9ºC e 69,97% na terceira semana e 28,48ºC e 74,51% na quarta semana; 27,6ºC e 74,1% na quinta semana.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, em seis tratamentos e seis repetições, com 18 aves por parcela experimental. Os tratamentos consistiram em dietas experimentais isonutritivas e isoenergéticas, variando na inclusão de cobre, na forma de complexo metal aminoácido (Cu-CAA) em 0, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5 mg/kg. Os níveis de inclusão do complexo foram baseados a partir do nível de referência de 10 mg/kg do cobre inorgânico como recomendado pelo manual da linhagem (Dekalb White – Nutrition Guide, 2020), logo correspondendo a 0, 15, 30, 45, 60 e 75% do nível de referência. O cobre utilizado no estudo é um complexo com relação de 1:1 com os aminoácidos alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais do manual da linhagem, e o premix mineral utilizado foi composto por zinco, manganês, cobre, ferro e selênio (fontes orgânicas) e iodo (fonte inorgânica). Todas as dietas experimentais apresentaram inclusão de 600 FTU/kg da enzima comercial fitase (ABVista – Quantum Blue) (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Composição calculada dos premixes mineral.

Minerais[1]	Nível de inclusão de cobre complexo aminoácido (mg/kg)					
	0	**1,5**	**3,0**	**4,5**	**6,0**	**7,5**
Zinco	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
Manganês	0,0797	0,07967	0,0797	0,0797	0,0797	0,0797
Cobre	0,0000	0,0015	0,0030	0,0045	0,0060	0,0075
Ferro	0,0450	0,0450	0,0450	0,0450	0,0450	0,0450
Selênio	0,0225	0,0225	0,0225	0,0225	0,0225	0,0225
Iodo	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Inerte[2]	0,0077	0,0062	0,0047	0,0032	0,0017	0,0002
Total	0,2050	0,2050	0,2050	0,2050	0,2050	0,2050

[1]Availa Zn: 120g/kg de zinco, Availa Mn: 80 g/kg de manganês, Availa Cu: 100 g/kg de cobre, Availa Fe: 100 g/kg de ferro, Availa Se: 1000 mg/kg de selênio. Iodato de cálcio: 62,8% de iodo. [2] Areia lavada.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais para pintainhas poedeiras.

Ingredientes, %	
Milho	58,884
Farelo de soja	35,682
Óleo de soja	1,444
Calcário calcítico	1,652
Fosfato Bicálcico	1,200
Bicarbonato de sódio	0,200
Sal Comum	0,290
DL-metionina 99	0,271
L-treonina 98,5	0,013
Premix mineral	0,205
Premix vitamínico[1]	0,150
Fitase[2]	0,006
Total	100,000
Composição química, %	
Energia metabolizável, kcal/kg	2975,00
Proteína Bruta[3]	22,69
Matéria Seca[3]	88,12
Matéria Mineral[3]	6,59
Fósforo	0,46
Cálcio	1,05
Sódio	0,18
Potássio	0,84
Cloro	0,24
Lisina digestível	1,01
Metionina digestível	0,55
Metionina + Cistina digestível	0,84
B. eletrolítico, mEq/kg	225,71

[1] Vitamina A (mín): 9.000.000,00 UI/kg, Vitamina D3 (min): 2.500.000,00 UI/kg, Vitamina E (min): 20.000,00 UI/kg, Vitamina K3 (min): 2.50 g/kg, Vitamina B1 (min): 2.0 g/kg, Vitamina B2 (min): 6.0 g/kg, Vitamina B6

(min): 3.0 g/kg, Vitamina B12 (min): 15.000,00 meg/kg, Niacina (min): 35.00 g/kg, Ácido Fólico (min): 1.50 g/kg, Ácido pantatênico (min): 11.00 g/kg, Biotina (min): 0.10 g/kg. [2] Fitase (mín) 10.000 FTU/g; [3]Valores analisados segundo metodologia de Detmann et al. (2021).

4.2 Eutanásia e coleta de material biológico

Aos 35 dias de idade, uma pintainha por parcela experimental foi selecionada, de acordo com o peso corporal médio final para a fase (347,83 g). As aves foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical de acordo com a resolução normativa nº 37/2018 do CONCEA, realizado por profissional experiente e capacitado. Após eutanásia, os animais foram levados a laboratório e realizada incisão na parede abdominal para acesso a cavidade e assim realizado a coleta do intestino. Foram coletados dois fragmentos de cada porção do intestino. As amostras de duodeno foram obtidas na porção descendente da alça duodenal, o jejuno foi coletado fragmentos em uma região de 5 centímetros de distância do divertículo de Meckel como referência e, por fim, as amostras de íleo foram obtidas em uma região de distância de 5 centímetros da junção íleo-colón-cecal.

Todos os fragmentos foram clivados em 40 mm e dispostos de forma aberta, lavados com água destilada para remoção do conteúdo intestinal e acondicionados em recipientes contendo formol a 10% para fixação.

4.3 Processamento histológico

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Patologia Animal, utilizando as metodologias descritas por Junqueira e Carneiro (2018). Após fixação, os fragmentos foram clivados em porções menores de 15 mm de comprimento e acondicionados em cassetes histológicos identificados. O material foi desidratado por submersão em crescentes concentrações de álcool (70 a 100%), clarificados em xilol absoluto e impregnados em parafina em estufa a 60°C. Na emblocagem, foi utilizado o incorporador modular da Leica (EG 1150H), onde os fragmentos foram emblocados em parafina histológica derretida a 70°C e em seguida foram submetidos a microtomia para obtenção de cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, com auxílio do micrótomo automático Leica Histocore Autocut, específico para corte de tecidos em parafina, sendo obtidas fitas com 6 cortes, as quais foram transferidas para o banho-maria a 40°C. Os cortes foram distendidos na superfície da água, sendo desprezado os cortes iniciais e finais da fita, sendo capturados e dispostos em lâminas apenas os cortes centrais, e assim obteve-se duas lâminas por segmento intestinal, com dois cortes, totalizando 216 lâminas.

Para coloração, as lâminas foram desparafinadas em estufa a 60ºC por aproximadamente 12 horas e posteriormente submersas em dois banhos de xilol por 10 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram submetidas a hidratação por uma série decrescente de álcoois (100 a 70%) por

2 minutos em cada banho e posteriormente lavadas em água destilada por 6 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Meyer por 30 segundos, lavadas em água corrente em baixa pressão por 10 minutos e posteriormente submersas em eosina amarelada por 2 minutos. Após a coloração, os tecidos nas lâminas foram desidratados em uma série de álcoois, 70% por 1 minuto, 90% por 1 minuto e dois banhos de 100% por 3 minutos cada, e por fim, dois banhos em xilol por 5 minutos em cada banho. A montagem das lâminas foi realizada com lamínula e bálsamo do Canadá. As lamínulas foram lavadas em solução de limpeza, composta por água destilada, álcool absoluto, ácido acético glacial e detergente neutro em proporções iguais. A limpeza tem por objetivo eliminar qualquer partícula de poeira ou outro componente suspenso que pode atrapalhar a visualização do tecido no microscópio (Figura 3).

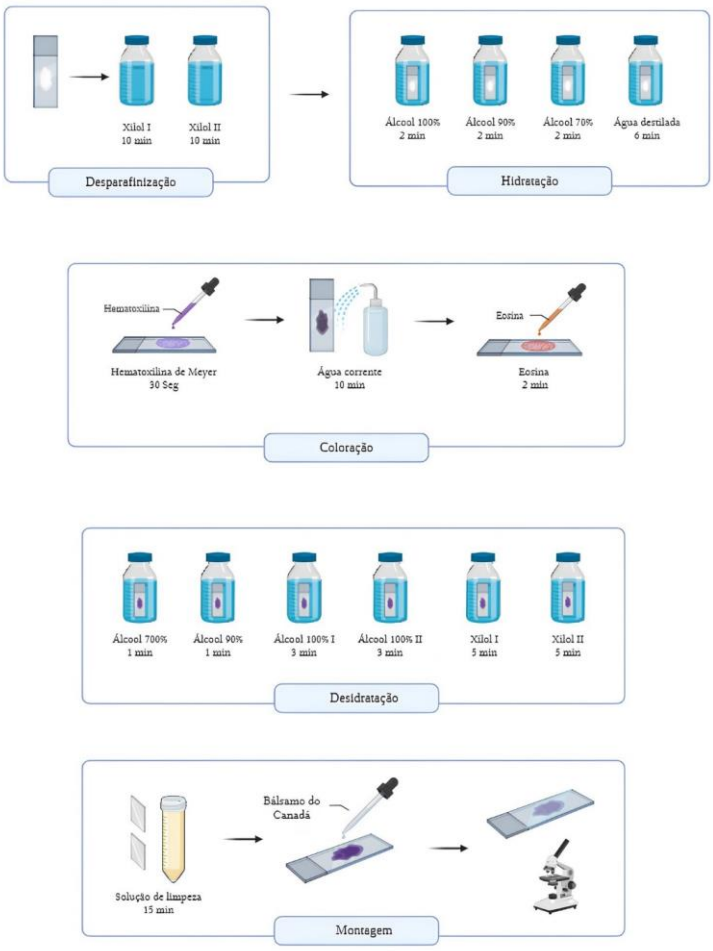

Figura 3. Coloração e montagem das lâminas para leitura dos tecidos. Fonte: Arquivo pessoal

4.4 Morfologia intestinal

Todos as lâminas histológicas foram analisadas através de imagens digitalizadas, obtidas em aumentos de 4 vezes para os cortes de duodeno e 10 vezes para os demais cortes (jejuno e

íleo). As imagens foram realizadas com a utilização de microscópio óptico Olympus BX-51 acoplado à câmera e conectado a um computador com o software Leica LAS-EZ.

Para as variáveis de altura do vilo (µm), largura do vilo (µm), profundidade de cripta (µm), largura de cripta (µm), e relação vilo:cripta, foram realizadas 90 mensurações, por segmento intestinal, com auxílio do software Image J (Rasbrand, 2004), sendo selecionado as regiões mais íntegras das lâminas, sem artefatos e com estrutura morfológica preservada (Figura 4).

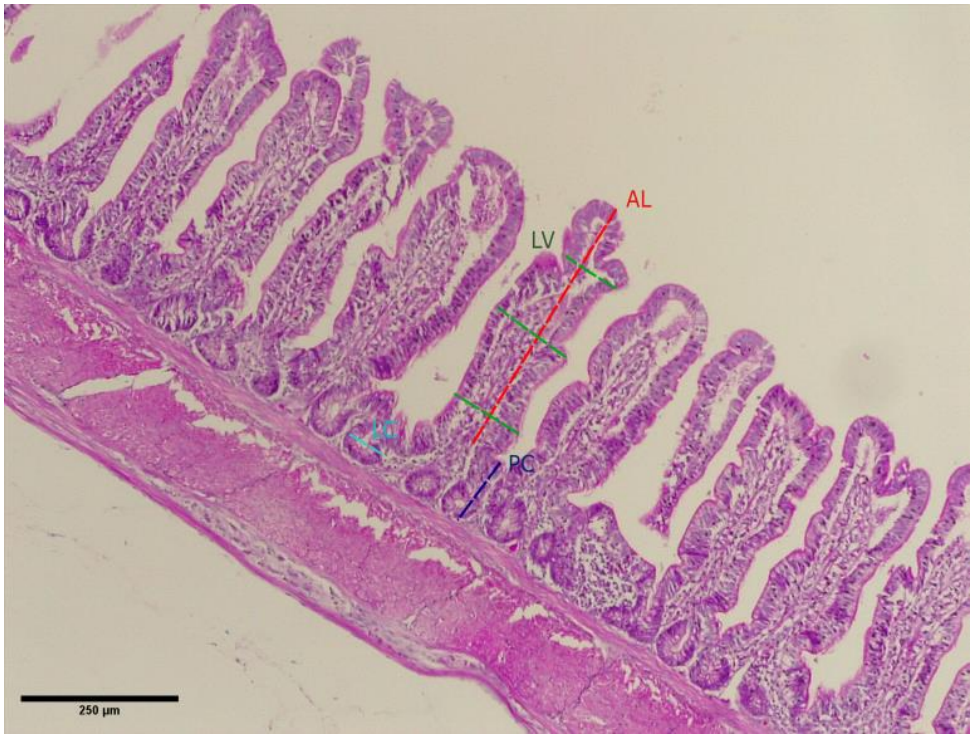

Figura 4. Fotomicrografia das vilosidades intestinais de pintainhas poedeiras, coloração H&E. As linhas indicam as medidas de altura de vilosidade (AL), largura da vilosidade (LV) (região apical, medial e basal), profundidade (PC) e largura da cripta (LC). Fonte: Arquivo pessoal

A partir das mensurações, utilizou-se a fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002) com a finalidade de analisar a área de superfície (µm²) dos segmentos intestinais.

$$AS = \frac{(largura\ do\ vilo\ x\ altura\ do\ vilo) + \left(\frac{largura\ do\ vilo}{2} + \frac{largura\ da\ cripta}{2}\right)^2 - \left(\frac{largura\ do\ vilo}{2}\right)^2}{\left(\frac{largura\ do\ vilo}{2} + \frac{largura\ da\ cripta}{2}\right)^2}$$

Quanto a avaliação morfológica da mucosa intestinal, foram realizadas observações em cada segmento intestinal e descritas as alterações morfológicas pertinentes para o presente estudo, sendo avaliadas 30 vilosidades por tratamentos experimental e quantificada a porcentagem de vilos normais (PN) e de vilos com perda de epitélio e exposição do tecido conjuntivo (PEC). As vilosidades PEC, foram avaliadas e classificadas quanto ao grau de perda de epitélio: grau 0, sem extrusão aparente; grau 1, pequena área de extrusão no ápice do vilo;

grau 2, perda do epitélio com exposição do conjuntivo no ápice; grau 3, perca de epitélio e exposição do conjuntivo até a metade do conjuntivo. Todos os procedimentos de classificação da perda de epitélio e exposição do tecido conjuntivo seguindo metodologia adaptada de Gomide *et al*. (2004).

4.5 Estereologia

Para complementar as informações obtidas com as análises histológicas de medidas lineares, utilizou-se de técnicas de análise estereológica dos segmentos intestinais. A técnica proposta por Baddeley *et al*. (1986), usada para a quantificação de estruturas tridimensionais a partir de imagens bidimensionais.

A análise foi utilizada para a determinação do volume parcial ocupado pela mucosa do intestino. Nesta técnica, foi utilizado um sistema teste do tipo cicloide (Figura 5), com 35 arcos cicloides e 70 pontos teste sobrepostos sobre cada imagem. O volume parcial é expresso em porcentagem e obtido pelo número de pontos teste sobre a superfície da mucosa e o número total de pontos na grade.

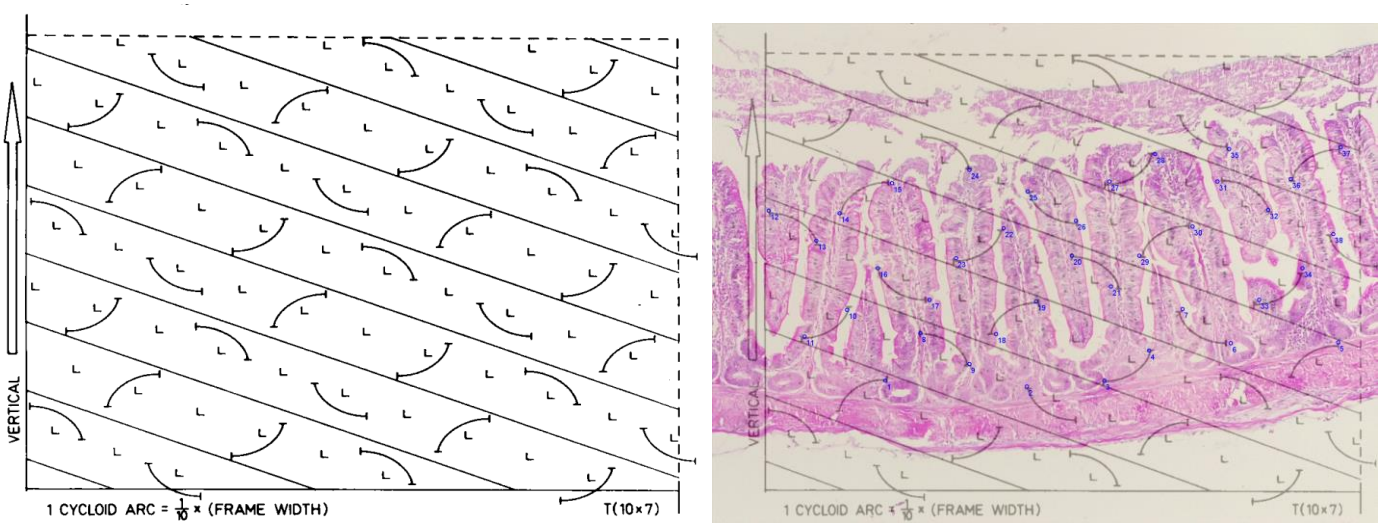

Figura 5. Grid proposto por Baddely *et al*. (1986) para análise estereológica de estruturas anisotrópica.

4.6 Análise estatística

Os dados foram previamente submetidos a análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene. Os dados foram analisados quanto às diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizando análise de variância (ANOVA). O modelo estatístico usado foi: $Yijk = \mu + t + eijk$, em que *Yijk* é a observação das medidas do intestino, μ é a média dos dados, *t* é o efeito dos níveis de suplementação de Cu-CAA na dieta (Tratamentos) e *eijk* é o efeito residual. As respostas das variáveis histomorfometricas, foram modeladas usando regressão polinomial de segundo grau,

a partir do modelo: $Y = a + b1x + b2x^2$, em que em que *Y* são as medidas lineares do intestino; *a* é a interceptação no eixo Y; *b1* e *b2* são os coeficientes da equação quadrática; *x* é o nível de suplementação de cobre orgânico. A estimativa do consumo ideal de cobre foi determinada utilizando a primeira derivada da equação de regressão ($x = -b1/2*b2$). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando os pacotes agricolae, agroR e AgroReg pertencente ao software R (R Development Core Team, 2008; Shimizu, Marubayashi e Goncalves, 2023).

Para a quantificação do percentual de vilos normais e com perda de epitélio, os dados foram submetidos ao teste do qui-quadrado, quanto aos graus de perda de epitélio, as frequências absolutas foram submetidas ao teste G, ambas as análises foram realizadas no programa BioEstat 5.3, utilizado nível de significância de 5%. Os resultados foram apresentados em frequência percentual (%) a partir de gráficos de barras agrupadas.

5. RESULTADOS

Os dados histomorfométricos e respectivas análises de regressão quadrática foram sumarizadas na Tabela 3.

Para o segmento do duodeno, não foram observados efeitos significativos ($p>0,05$) dos níveis de ingestão de cobre complexo aminoácidos (Cu-CAA) sobre as variáveis morfológicas, com exceção da profundidade da cripta, sobre o qual a análise de regressão quadrática demonstra efeito significativo ($p=0,03$) de aumento até o ponto de profundidade da cripta máxima (0,066 mg/ave/dia) e posterior redução (Figura 6). Para o jejuno, foi possível observar efeito significativo ($p<0,05$) do cobre suplementar sobre as variáveis de altura do vilo, relação vilo:cripta, área de superfície e volume parcial da mucosa. A análise de regressão polinomial de segundo grau, indicou estimativas para obtenção de valores mínimos para as variáveis.

Tabela 3. Variáveis histomorfometricas do duodeno, jejuno e íleo de pintainhas poedeiras com 35 dias alimentadas com níveis de suplementação de cobre complexo aminoácidos.

	Ingestão de cobre complexo aminoácidos (Cu-CAA)[1]						CV[2]	P-valor[3]
	0	0,03	0,061	0,092	0,123	0,153		
Altura do vilo (µm)								
Duodeno	1063,03	963,45	1012,96	1100,68	907,94	902,84	0,16	0,470
Jejuno	650,28	461,45	454,65	426,78	377,24	574,35	0,29	<0,001
Íleo	299,71	328,50	522,28	401,62	297,82	315,00	0,36	0,004
Profundidade da cripta (µm)								
Duodeno	164,82	190,80	195,31	192,48	161,16	148,57	0,19	0,030
Jejuno	118,02	99,37	136,51	104,70	94,77	121,66	0,25	0,615
Íleo	102,78	106,70	133,04	167,18	118,5	139,81	0,28	0,048
Largura da cripta (µm)								
Duodeno	87,64	73,41	71,34	70,73	69,60	68,18	0,23	0,227
Jejuno	81,66	78,01	72,92	64,49	94,33	68,49	0,18	0,156
Íleo	66,50	57,71	69,92	56,75	57,02	60,68	0,16	0,753
Relação vilo:cripta (µm)								
Duodeno	6,50	4,69	5,45	5,66	5,75	5,91	0,22	0,182
Jejuno	5,22	4,94	3,29	3,94	4,62	4,85	0,31	0,008
Íleo	3,00	3,07	4,01	2,40	2,54	2,39	0,33	0,030
Área de superfície (µm²)								
Duodeno	12,52	12,59	13,52	15,49	13,38	13,19	0,07	0,250
Jejuno	8,05	5,72	5,90	5,74	4,77	8,16	0,10	<0,001
Íleo	4,77	5,49	7,15	5,26	5,36	5,23	0,24	0,009
Volume parcial da mucosa (%)								
Duodeno	50,57	57,85	53,14	50,35	50,85	58,00	0,17	0,216
Jejuno	60,42	55,85	44,04	40,71	46,42	61,22	0,21	<0,001
Íleo	34,92	48,39	49,28	42,04	37,95	38,03	0,23	<0,001

[1] Ingestão calculada a partir do consumo médio de ração durante o período experimental. [2]Coeficiente de variação. [3]Probabilidade da análise de regressão quadrática.

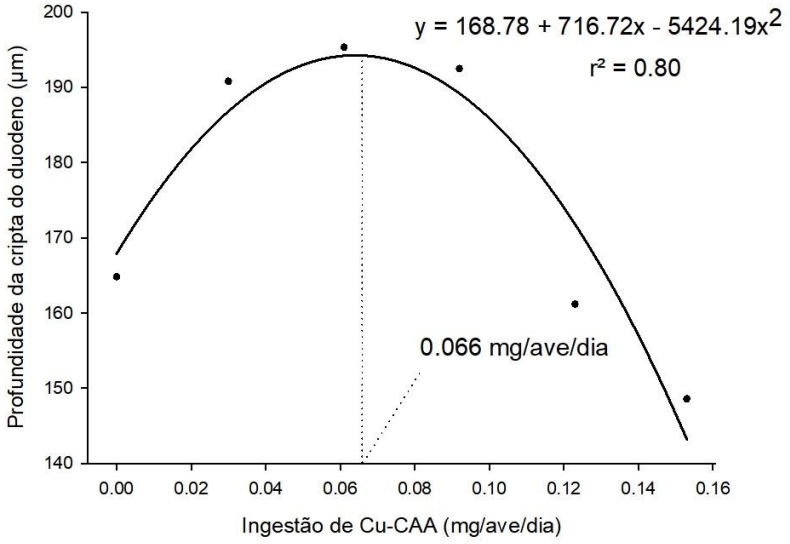

Figura 6. Curva ajustada para regressão quadrática para a profundidade das criptas do duodeno. As estimativas de consumo ideal, indicaram ponto máximo de 0.066 mg/ave/dia de Cu-CAA.

A altura das vilosidades do jejuno (AVj) foi afetada negativamente a partir da suplementação de 4,5 e 6 mg/kg da dieta. A interação dos níveis de ingestão de cobre e a AVj, a partir da regressão quadrática, demonstrou redução na variável a partir da ingestão de 0,085 mg/ave/dia. Para a relação vilo:cripta do jejuno (VCj) foi observado uma tendência à redução quando os níveis de ingestão atingiram 0,061 mg/ave/dia, sendo estimado pela regressão, que o menor valor foi obtido com ingestão de 0,083 mg/ave/dia (4 mg/kg da dieta), sendo posteriormente restabelecido os valores da relação não apresentando diferenças entre os níveis de suplementação a partir de 6 mg/kg da dieta. A área de superfície da vilosidade do jejuno (ASj) apresentou tendência de redução quando ocorre o incremento do nível de Cu-CAA com posterior aumento desta variável, sendo estimado pela regressão quadrática que a menor área de absorção para a variável pode ser encontrada quando a ingestão atinge 0,078 mg/ave/dia (3,8 mg/kg da dieta). O mesmo comportamento foi observado quando avaliado o volume parcial da mucosa do jejuno, com estimativa de ingestão de 0,079 mg/ave/dia (Figura 7).

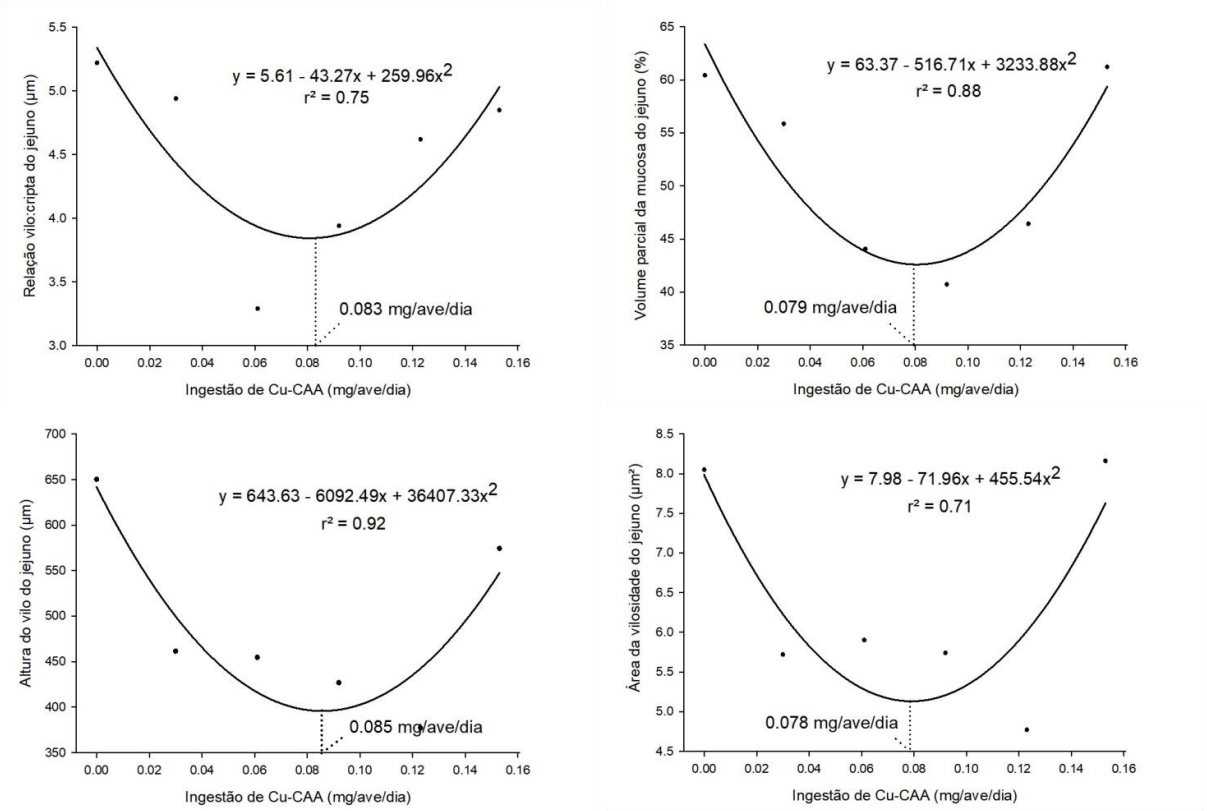

Figura 7. Curva ajustada para regressão quadrática das variáveis histomorfometricas do jejuno. As estimativas de consumo ideal, indicaram ponto mínimo de 0.083, 0.085, 0.078 e 0.079 mg/ave/dia de Cu-CAA.

Para as avaliações histomorfometricas do íleo, foram observados efeitos significativos ($p<0,05$) do nível de suplementação de Cu-CAA sobre a altura do vilo, profundidade da cripta, relação vilo:cripta, área de absorção e volume parcial da mucosa do íleo para pintainhas poedeiras em fase de cria. Para altura das vilosidades do íleo (AVi), a regressão quadrática estimou, para máxima altura de vilosidade o valor de ingestão de 0,074 mg/ave/dia, aproximadamente 3,6 mg/kg da dieta. Apesar da ingestão de cobre ter beneficiado o desenvolvimento das vilosidades ileais, a profundidade de cripta (PCi) para as ingestões que apresentaram maior vilosidade, se apresentaram mais profundas, consequentemente, reduziu a relação vilo:cripta do íleo. A área de superfície das vilosidades (ASi) e o volume parcial da mucosa (Vvi) apresentaram comportamento semelhantes, sendo estimado a partir das regressões, para máxima área e máximo volume, uma ingestão de 3,7 e 3,3 mg/kg da dieta (Figura 8).

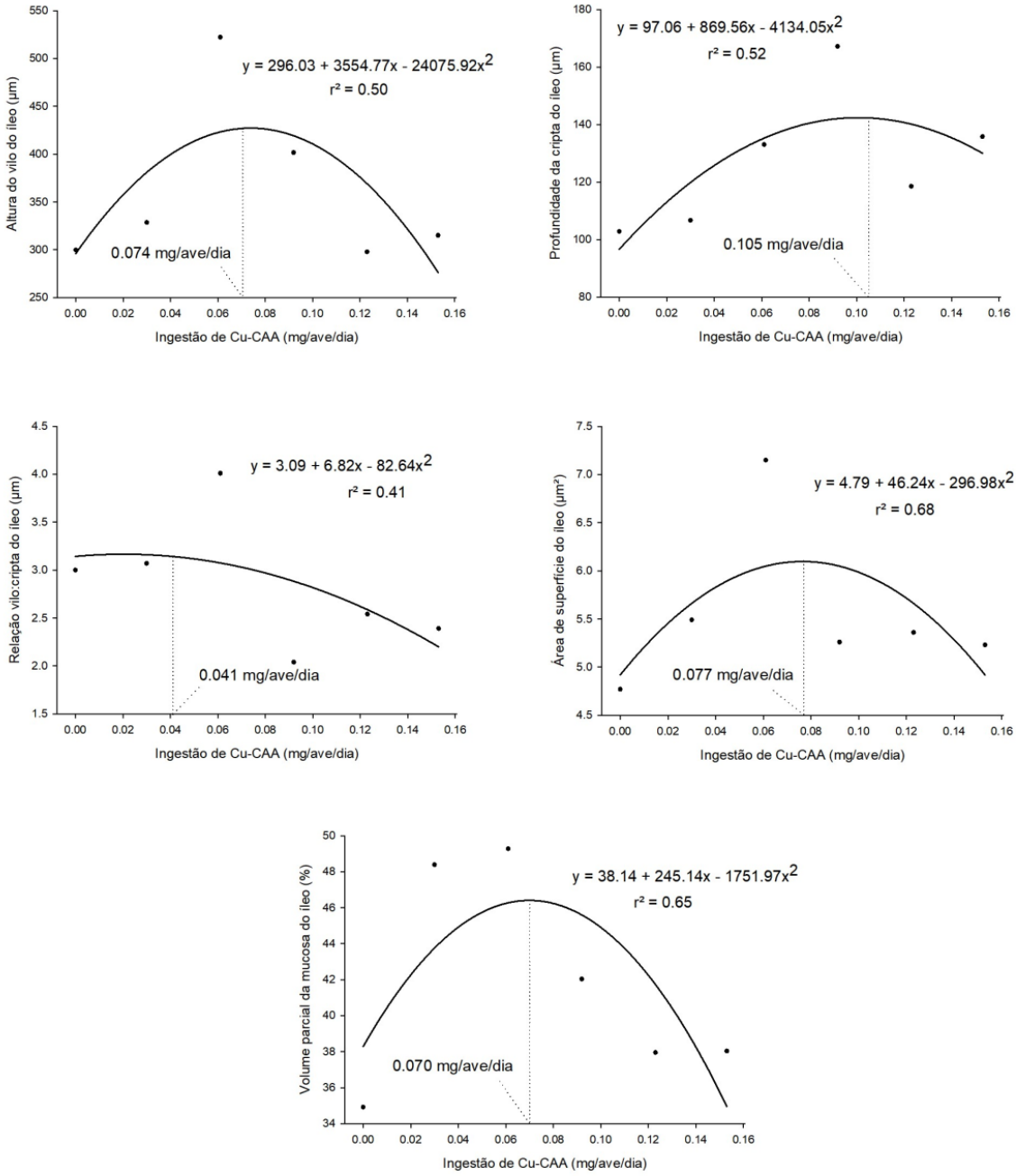

Figura 8. Curva ajustada para regressão quadrática das variáveis histomorfometricas do íleo. As estimativas de consumo ideal, indicaram ponto máximo de 0.074, 0.105, 0.041, 0.077 e 0.077 mg/ave/dia de Cu-CAA.

De acordo com a Figura 9, pode-se observar que houve efeito dos níveis de cobre orgânico (Cu-CAA) sobre a porcentagem de vilos normais e com perda de epitélio do duodeno de pintainhas poedeiras com 35 dias de vida.

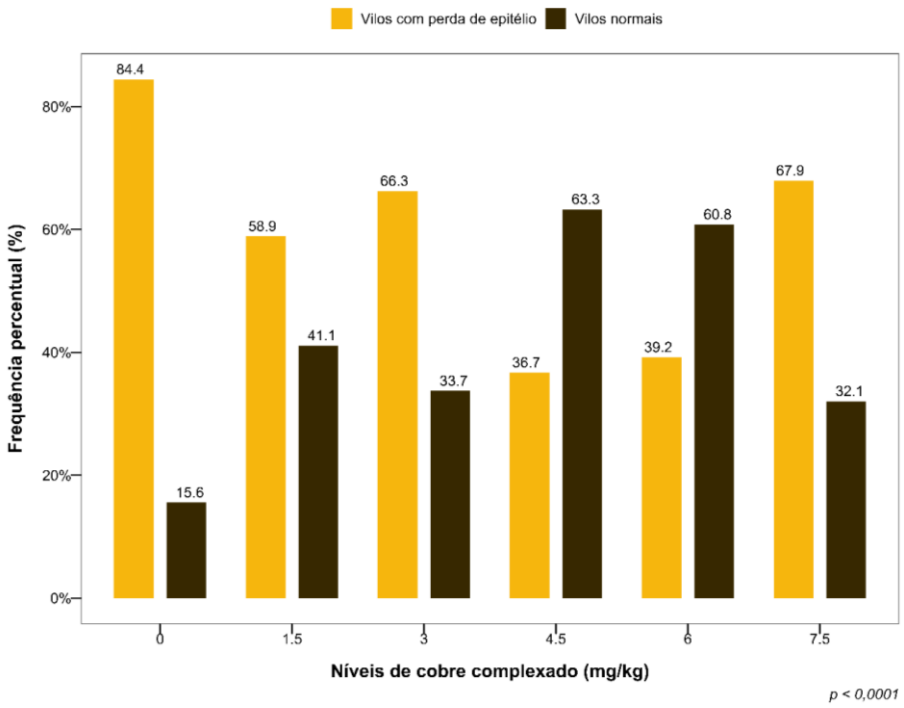

Figura 9. Frequência percentual (%) de vilos normais (PN) e vilos com perda de epitélio (PEC) no duodeno de pintainhas poedeiras com 35 dias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de cobre complexado a aminoácidos.

Para o segmento intestinal do jejuno, foram observados efeitos significativos dos níveis de cobre orgânico sobre o percentual de vilos normais e com perda na mucosa intestinal de pintainhas (Figura 10). É possível observar que toda a mucosa do jejuno apresentou-se com perda de epitélio, sendo observado maior número de vilosidades com perda nos níveis de suplementação entre 1.5 e 3.0 mg/kg da dieta, podendo assim explicar a baixa relação vilo:cripta e de volume parcial da mucosa encontrada para este segmento. Apesar do alto percentual de PEC, quando suplementado com níveis variando de 4.5 a 6.0 mg/kg, apresentaram número de vilos normais maiores ou semelhante a PEC, concordando assim com os achados nas estimativas de ingestão de cobre complexado a aminoácidos.

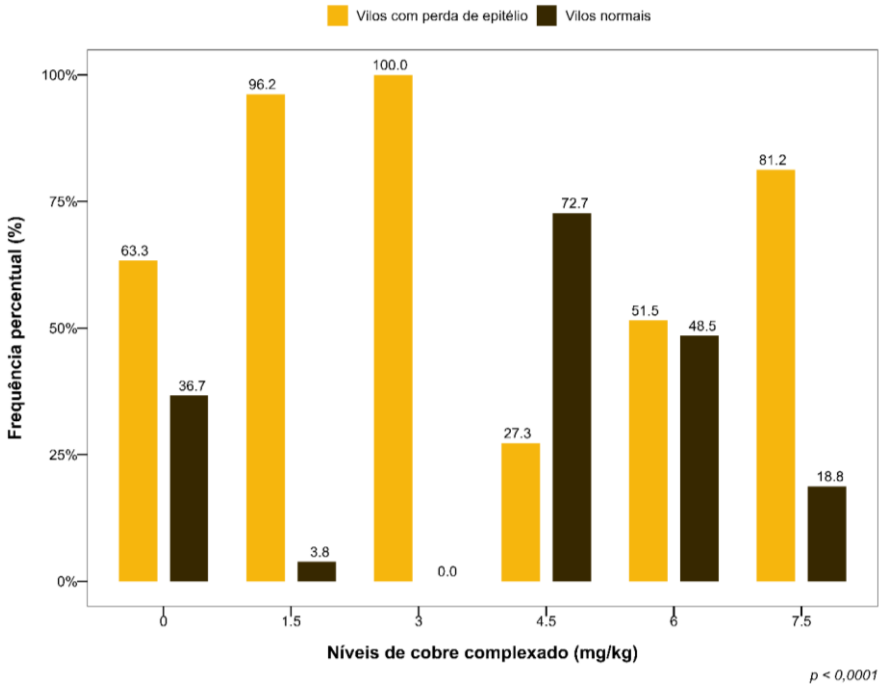

Figura 10. Frequência percentual (%) de vilos normais (PN) e vilos com perda de epitélio (PEC) do jejuno de pintainhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de cobre complexado a aminoácidos.

Foi observado efeito significativo (p<0,0001) dos níveis de Cu-CAA sobre a frequência percentual de vilosidades normais e com perda de epitélio no íleo das pintainhas poedeiras (Figura 11).

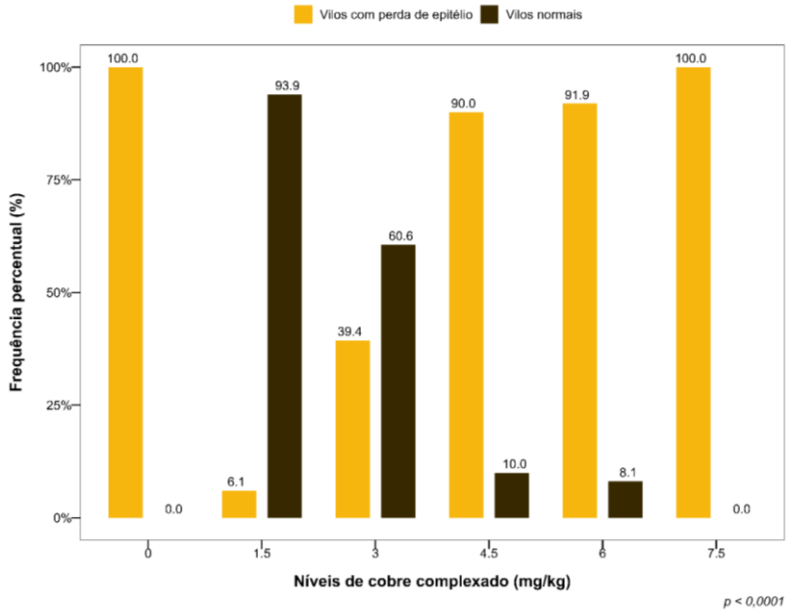

Figura 11. Frequência percentual (%) de vilos normais (PN) e vilos com perda de epitélio (PEC) do íleo de pintainhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de cobre complexado a aminoácidos.

Tanto as aves sem suplementação de Cu-CAA quanto as aves suplementadas com o nível máximo utilizado no presente estudo, apresentaram 100% dos vilos da mucosa ileal comprometidos, quando associados com os dados histomorfométricos, é possível observar que

ambos os tratamentos de cobre suplementar foram os que apresentaram menores áreas de absorção e volume parcial da mucosa.

O percentual dos graus de perda de epitélio apresentados pelos vilos do duodeno, jejuno e íleo, de pintainhas de postura, estão apresentados na Figura 12. A partir do teste G, foi possível observar que a suplementação de Cu-CAA influenciou significativamente ($p < 0,05$) o grau de perda de epitélio nos diferentes segmentos intestinais.

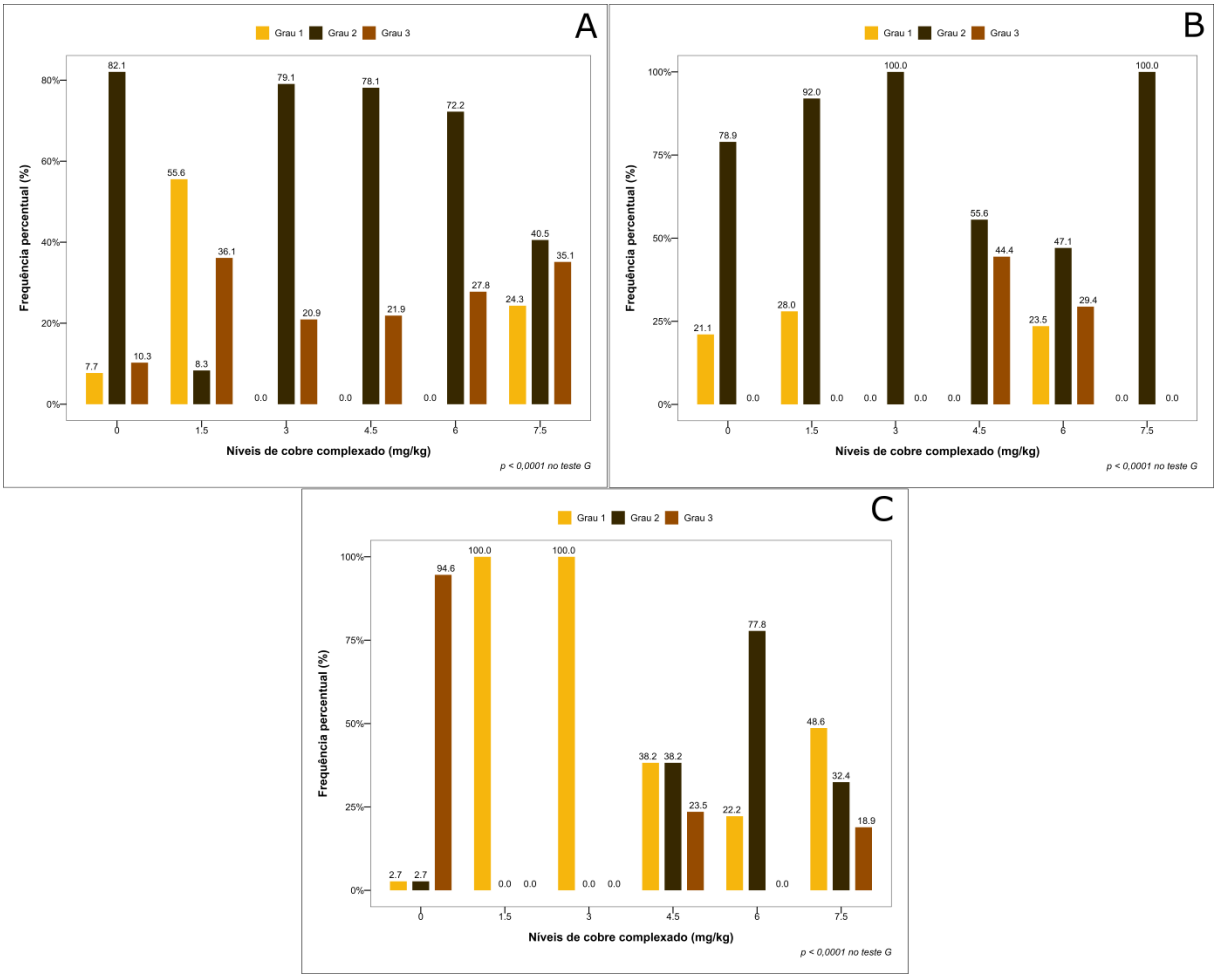

Figura 12. Frequência percentual (%) dos graus de perda de epitélio e exposição do conjuntivo do duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) de pintainhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de cobre complexado a aminoácidos.

6. DISCUSSÃO

A absorção do Cu ocorre principalmente nos segmentos do duodeno e jejuno, sendo uma quantidade mínima absorvida no íleo e o excedente resulta na excreção do mineral (Linder; Hazegh-Azam, 1996). Os problemas de saúde intestinal são frequentemente discutidos na avicultura industrial de corte e postura, especialmente no contexto da interação da digesta com a mucosa, podendo ocasionar ineficiência da digestão e absorção de nutrientes. Diante disto, a morfologia da mucosa intestinal, de suas vilosidades e criptas, refletem a função e a saúde do

órgão, mediante das relações da taxa de crescimento, desenvolvimento e ação das secreções enzimáticas na mucosa (Chiou *et al*., 1999).

Dentre os parâmetros morfológicos, a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, sendo estruturas microscópicas do trato gastrointestinal das aves, se comportam como bons indicadores do estado em que o animal responde à dieta. No presente trabalho, apenas o jejuno e íleo apresentaram diferenças quanto a altura de vilosidade e para profundidade da cripta, o duodeno e íleo, indicando possíveis alterações da dinâmica de *turnover* celular na mucosa intestinal.

A homeostase da mucosa intestinal depende da manutenção do tamanho da população de células, a partir de fatores hormonais, nutricionais e patológicos. Desse modo, é necessária a manutenção do equilibro entre o índice de proliferação (renovação) e de morte celular (apoptose e seguinte extrusão). O crescimento do tamanho do vilo e o aumento no número desses vilos envolve os eventos de proliferação celular que ocorre nas criptas de Lieberkuhn, que ocorrem mediante as células totipotentes. As células totipotentes apresentam alta taxa mitótica e que se diferenciam ao longo de toda a superfície do vilo, até que são empurradas para o ápice, sendo influenciado por aumento ou redução da taxa de renovação celular por fatores como a própria passagem da digesta e ação de enzimas pancreáticas, expõe a mucosa intestinal a condições adversas a sua integridade (Boleli; Morita, 2017).

No presente estudo, foi possível observar um incremento na altura das vilosidades quando os animais consumiram Cu-CAA, nos segmentos do duodeno e íleo, pode ser devido à maior biodisponibilidade das moléculas de cobre, mantendo-se assim a integridade e a função da mucosa, contudo é possível que a taxa de proliferativa das criptas de novas células não tenha reduzido, devido ao registro de valores de criptas profundas e largas. Para a variável de relação entre altura do vilo e profundidade de cripta, autores como Pluske *et al*. (1997), descrevem que quanto maior a relação melhor a homeostase da mucosa intestinal, e que vilosidades atrofiadas e criptas hiperplásticas são geralmente associadas a menor desempenho dos animais devido à queda na capacidade absortiva e digestiva do intestinal delgado. Yue *et al*. (2017) avaliando a suplementação de cobre para leitões desmamados e seus efeitos sobre o desempenho e a morfologia do intestino delgado, observou que o quelato de cobre aumentou a altura das vilosidades, criptas rasas e melhor relação vilo:cripta. Nguyen *et al*. (2022) avaliando a inclusão de duas diferentes fontes de cobre para frangos de corte, observaram aumento no vilo do jejuno das aves que consumiram dietas contendo cobre hidroxicloreto, contudo não foram observados efeitos para profundidade da cripta e relação V:C de acordo com a fonte suplementar.

Fisiologicamente, se é esperado que a altura do vilo, seja reduzida da região anterior para a posterior, sendo maior no duodeno do que no jejuno e íleo, e maior no jejuno do que no íleo (Morita, 2011). O presente trabalho elucidou que para as aves suplementadas com Cu-CAA, o íleo apresentou-se com vilosidades semelhante ou maiores que a região do jejuno. Este incremento, pode ter sido ocasionado pela deriva de nutrientes do duodeno para o íleo, estimulando a função de absorção da mucosa ileal, resultando em um desenvolvimento do segmento, e podendo ser relacionado também, com o maior índice de perda de epitélio registrado para o segmento, fazendo com que as vilosidades se tornem menores. Yu *et al*. (2008) estudando através de curvas cinéticas o processo de absorção de zinco em frangos, observaram que a absorção é mediada no duodeno e jejuno, por processo saturável, e no íleo este transporte é regulado por difusão simples (maneira menos insaturável), como complementariedade a esta conclusão, Bao *et al*. (2010a), avaliando a digestibilidade de diferentes fontes de minerais, determinam que a digestibilidade do cobre, seja de fonte orgânica (quelatos metal-aminoácido) ou inorgânica (sulfatos), apresenta coeficiente de digestibilidade semelhante em todos os segmentos do intestino delgado. Com isso, devido a facilidade de transporte no íleo através da membrana, é possível que a deriva deste nutriente para o segmento tenha promovido maior estímulo ao desenvolvimento da mucosa.

Levkut *et al*. (2017) estudando os efeitos do zinco de fonte orgânica e inorgânica sobre a morfologia do intestino de frangos de corte, observaram que a área de superfície do jejuno, quando suplementados com adição de quelato de zinco-glicina, apresentaram valores semelhantes ao da fonte inorgânica. Assim como o zinco, o cobre é requerido por diversos tecidos no organismo animal, modulando na proliferação e diferenciação de células-tronco intestinais (CTI). Yin *et al*. (2021), estudando a adição de cobre para suínos, não encontraram efeitos dos níveis de cobre na área de absorção do intestino delgado, contudo, os autores descrevem alterações na mucosa a partir das relações de altura de vilo e profundidade de cripta, ao qual observaram aumento do número de células Ki67+ (marcador de proliferação celular na cripta), quando se aumentou a suplementação de sulfato de cobre (variando de 25 a 125 mg/kg), comprovando a hipótese da ação do cobre sobre a modulação das CTI em suínos.

A análise esteorológica foi utilizada no presente estudo com objetivo de descrever possíveis alterações na superfície da mucosa absortiva do intestino delgado das poedeiras, associando assim com os valores encontrados para a medida linear de área de superfície. Os segmentos intestinais apresentaram diferentes proporções (%) de volume, sendo relacionado à função prioritária dos segmentos a maior ou menor atividade digestiva e absortiva. Segundo Pauletti *et al*. (2007), o aumento do volume parcial da mucosa, está relacionado com a presença

de vilosidade maiores e mais numerosas, sendo possível ser alterada por fatores nutricionais, pela microbiota intestinal e pela própria saúde intestinal. Com a inclusão do complexo aminoácidos, no segmento jejunal, foram observados redução nesse volume parcial da mucosa, resultando estar relacionado com a baixa densidade de vilos por área e menor perímetro neste segmento, sugerindo que houve uma menor perda celular, favorecendo a maior permanência dos enterócitos na mucosa intestinal, inibindo o desenvolvimento de novas vilosidades a partir de processos de fissão e brotamento (Boleli; Morita, 2017). No duodeno e íleo, com Cu-CAA, observou-se incremento nessa mucosa.

A morfofisiologia intestinal de pintainhas poedeiras pode ser influenciada positivamente pela fonte orgânica de cobre, uma vez que o Cu estimula diretamente a regeneração das vilosidades nas aves e pode impactar indiretamente a morfologia intestinal assim como os fatores que associados a esta mucosa, como a microbiota (Chiou *et al*., 1999). Zea e Vílchez (2014), encontraram que a suplementação de cobre em 250 ppm, de diferentes fontes (sulfato de cobre ($CuSO_4$), oxicloreto de cobre e cloreto de cobre tribásico) resultaram em maior altura de vilo do jejuno, quando comparado com tratamentos sem suplementação. É possível observar que as variáveis histomorfometricas para o tratamento sem suplementação é superior ou igual aqueles com suplementação de cobre, e diante disto é importante destacar que a dieta isenta do mineral orgânico, não era isenta de cobre em sua composição, devido a contribuição dos ingredientes, como o milho e farelo de soja na dieta, e que o cobre intrínseco pode ter sido suficiente para manter a dinâmica da mucosa intestinal promovendo melhor relação quando comparado aos níveis suplementados. O presente trabalho sugere que as dietas sem suplementação de cobre não afetaram negativamente a morfologia do intestino das pintainhas, devido a possibilidade da contribuição do micromineral presente nos ingredientes da dieta, contudo mais estudos relacionados a expressão dos transportadores de nutrientes e imuno-histoquímica, podem permitir melhor avaliação da integridade e desenvolvimento dessa mucosa, garantindo assim suas funções. Semelhante, Fry *et al*. (2012), reporta que as vilosidades do jejuno de suínos alimentados com cobre hidroxicloreto em 225 mg/kg, apresentaram altura similar aos suínos sem suplementação e superior aos suplementados com a fonte inorgânica ($CuSO_4$). Além disso, os pesquisadores puderam observar baixa expressão genica dos transportadores de cobre, metalotioneina e das metaloenzimas, observaram redução nos valores, nas aves sem suplementação de cobre.

Wen *et al*. (2022) constataram que a expressão do transportador CTR1 e ATP7A foram regulados para baixo quando suínos em terminação foram suplementados com 20 mg/kg de cobre proteinato ou cobre-glicina, no jejuno e no fígado. Esses resultados indicam que devido

à alta biodisponibilidade do mineral, as células diminuíram a expressão de mRNA desses dois genes para regular o fluxo de Cu celular, com objetivo de manter a homeostase. Quanto aos transportadores de peptídeos (PepT1) e o transportador de alanina-serina-cisteina (ASCT2), observaram maior expressão genica de ambos, nos tratamentos de Cu-proteinato e Cu-glicina, quando comparado ao $CuSO_4$, comprovando que os aminoácidos que se quelam ou complexam a molécula mineral, transportam o Cu para dentro da célula intestinal por endocitose, sofrendo dissociação, contudo, ainda são necessários mais estudos para elucidar esses achados.

Quanto a integridade da mucosa intestinal, no duodeno, foi possível observar alterações de todos os graus na mucosa em todos os tratamentos experimentais, sendo observado que apesar das diferenças percentuais, todas as vilosidades apresentaram, principalmente PEC grau 2. No jejuno, o comportamento da presença de perda grau 2 permaneceu, contudo houve uma redução nas perdas de epitélio grau 3, sendo apenas registrado 44,4% e 29,4% para a suplementação de 4,5 e 6 mg/kg, respectivamente. Para a suplementação de Cu-CAA de 7,5 mg/kg, dos 81,2% de vilosidades com perda de epitélio, 100% apresentaram perda grau 2, assim como para a suplementação de 3 mg/kg. Por sua vez, no íleo, a redução da suplementação a nível 0 de cobre, afetou significativamente as vilosidades da mucosa, apresentando 94,6% de PEC grau 3, o que não foi observado para os demais tratamentos que apresentaram cobre na dieta.

Os dados do presente estudo sugerem que as pintainhas apresentaram intensa renovação epitelial, devido a alto número de vilosidades com extrusão celular (PEC), contudo a metodologia adotada é apenas uma estimativa, já que Gomide *et al*. (2004) sugerem que a metodologia apropriada é a utilização da microscopia de varredura, permitindo uma conclusão mais confiável da capacidade digestiva e absortiva do intestino e da avaliação dos danos causados na mucosa.

A camada epitelial do intestino pode ser alterada por diversos fatores que influenciam diretamente as taxas de proliferação e renovação celular. Esses fatores podem ser a adaptação a ração exógena ingerida, exposição a colonização intestinal pela microbiota benéfica e o jejum pós-eclosão, como sugerido por Maiorka *et al*. (2003), em que sob jejum hídrico e/ou de alimento, ocorre aumento no número de vilos intestinais de pintos de corte, contudo em jejum prolongado, as células epiteliais passam a apresentar vacúolos, dando início a perda dos enterócitos (pela elevação da taxa de extrusão) e morte celular (Shamoto; Yamauchi, 2000). A contaminação de patógenos também podem contribuir para os danos a esta mucosa conforme constatado por Zhang *et al*. (2012), em estudos com animais desafiados com *Salmonella*

Typhimurium demonstraram perda na integridade epitelial das aves desafiadas, com redução nos teores da expressão gênica das proteínas de junções oclusivas.

Assim como Sterzo (2007), avaliando a morfologia do intestino de aves de corte infectados por *Salmonella enteritidis*, observou maior perda epitelial no duodeno, contudo comparando entre o tratamento controle e os pintos infectados não apresentaram alterações significativas, sendo observado para a mesma região, perda de epitélio grau 3. Estes estudos sugerem o potencial de utilização do cobre como modulador da microbiota intestinal, principalmente relacionado as características imunológicas. Entretanto, Chiou *et al*. (1999) observaram que o trato gastrointestinal de aves suplementadas com cobre apresentou lesões severas na cavidade oral e erosão na moela com inclusão de 500 mg/kg, sugerindo que a inclusão excessiva pode danificar a mucosa epitelial do trato gastrointestinal das aves. Os autores observaram que com a inclusão do mineral, houve redução na altura, profundidade de cripta e espessura da túnica muscular dos segmentos intestinais, contudo associam evidências indiretas com ação de outros fatores biológicos do organismo. Huang *et al*. (2021), avaliando o efeito subcrônico do cobre na histologia e microflora cecal de galinhas, observaram que a exposição ao sulfato de cobre destruiu a estrutura normal dos cecos das aves, permitindo formação de vacúolos e de infiltração inflamatória. Curiosamente, Cheng *et al*. (2020) e Ruan *et al*. (2019) observaram em ratos suplementados com cloreto de cobre, lesões histopatológicas em todo o tecido intestinal, principalmente atrofia das vilosidades e das células caliciformes, assim como necrose dos enterócitos.

Todas as estruturas e alterações morfológicas da mucosa intestinal do duodeno jejuno e íleo de pintainhas poedeiras com 35 dias de idade suplementadas com Cu-CAA, podem ser observadas nas Figuras 13, 14 e 15.

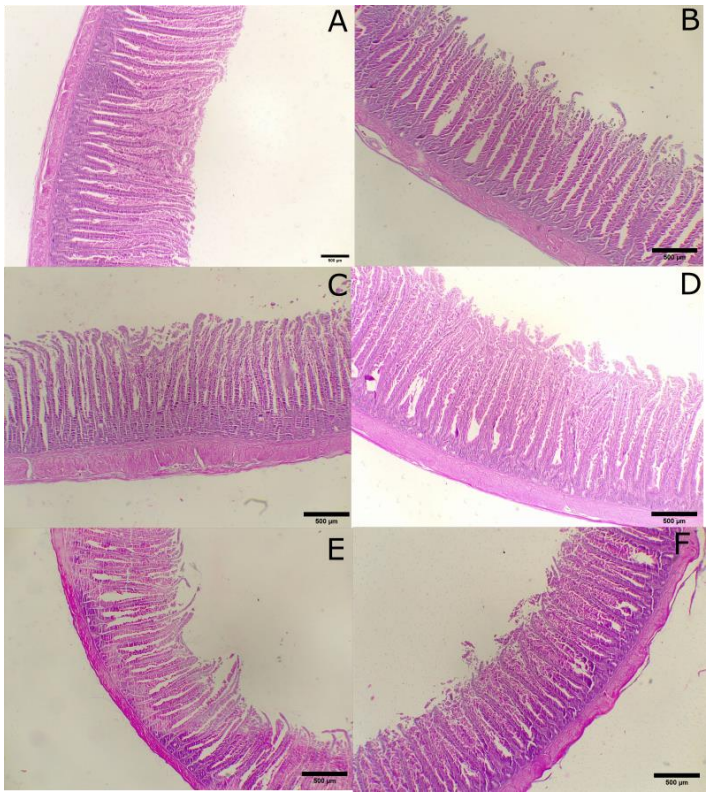

Figura 13. Morfologia da mucosa do duodeno de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos. Letras maiúsculas em cada fotomicrografia difere os níveis de suplementação: (**A**) 0, (**B**) 1.5, (**C**) 3, (**D**) 4.5, (**E**) 6, (**F**) 7.5. Coloração: Hematoxilina e Eosina, 4x, barra com escala de 200 µm.

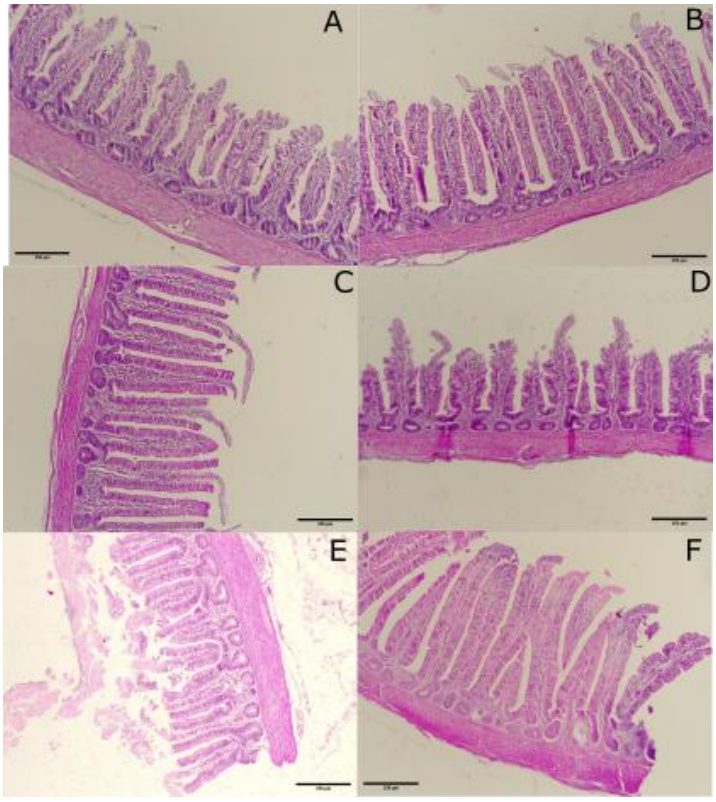

Figura 14. Morfologia da mucosa do jejuno de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos. Letras maiúsculas em cada fotomicrografia difere os níveis de suplementação: (**A**) 0, (**B**) 1.5, (**C**) 3, (**D**) 4.5, (**E**) 6, (**F**) 7.5. Coloração: Hematoxilina e Eosina, 10x, barra com escala de 200 µm.

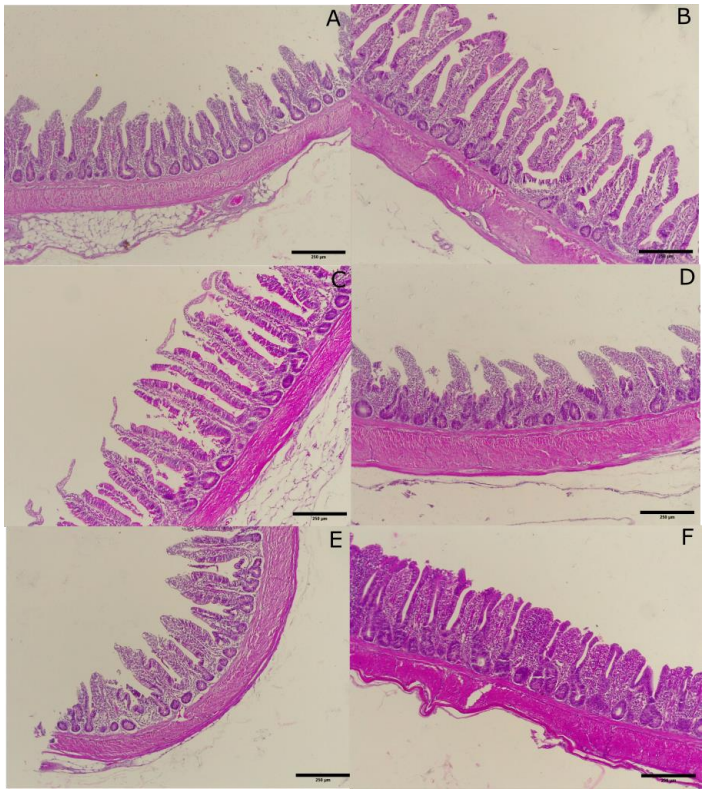

Figura 15. Morfologia da mucosa ileal de pintainhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de cobre complexo aminoácidos. Letras maiúsculas em cada fotomicrografia difere os níveis de suplementação: (**A**) 0, (**B**) 1.5, (**C**) 3, (**D**) 4.5, (**E**) 6, (**F**) 7.5. Coloração: Hematoxilina e Eosina, 10x, barra com escala de 200 µm

7. CONCLUSÃO

A suplementação de cobre complexado a aminoácidos em níveis de 3,0 a 3,5 mg/kg da dieta, associada a dietas com inclusão de fitase, melhora a morfometria intestinal e morfologia da mucosa intestinal das aves. Doses elevadas ou ausência de suplementação podem causar danos à mucosa, comprometendo a absorção de nutrientes. Logo, a suplementação do cobre, em sua forma de complexo aminoácidos, deve ser ajustada para otimizar a saúde intestinal sem prejudicar a integridade estrutural da mucosa.

8. REFERÊNCIAS

AAFCO. Official feed terms, common or usual ingredient names and ingredient definitions. Em: **American Association of Feed Control Officials Publication**. p. 345–544. 2023

ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 313–327, 1 ago. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual**. 2024.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual**. 2023.

AZAD, S. K. et al. Effect of zinc concentration and source on performance, tissue mineral status, activity of superoxide dismutase enzyme and lipid peroxidation of meat in broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 58, n. 10, p. 1837–1846, 23 jun. 2017.

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259–276, 1 jun. 1986.

BAO, Y. M. et al. The Digestibility of Organic Trace Minerals along the Small Intestine in Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 1, p. 90–97, 2010a.

BAO, Y. M. et al. Trace mineral interactions in broiler chicken diets. **British poultry science**, v. 51, n. 1, p. 109–117, fev. 2010b.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de Monogástricos**. 3. ed. v. 1. 2021.

BERWANGER, E. et al. Copper requirements of broiler breeder hens. **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2785–2797. 2018.

BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. Em: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 75–95.

BOLELI, I. C.; MORITA, V. S. Mucosa gastrointestinal: crescimento, renovação, reparo e defesa. Em: MACARI, M.; MAIORKA, A. (Eds.). **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Editora Gráfica, 2017. p. 206–217.

BYRNE, L.; MURPHY, R. A. Relative Bioavailability of Trace Minerals in Production Animal Nutrition: A Review. **Animals**, v. 12, n. 15, 1 ago. 2022.

CÁMARA ARGENTINA DE PRODUCTORES E INDUSTRIALIZADORES AVICOLAS. Conclusiones de la Planificación Estratégica del Sector Ovoavícola 2024-2030. **CAPIA Informa**, p. 1–64, 2024.

CHENG, S. et al. Copper Changes Intestinal Microbiota of the Cecum and Rectum in Female Mice by 16S rRNA Gene Sequencing. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 2, p. 445–455, 1 fev. 2020.

CHIOU, P. W. S. et al. Effect of High Dietary Copper on the Morphology of Gastro-Intestinal Tract in Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 12, n. 4, p. 548–553, 1999.

EL-SHARAWY, M. E. et al. Studying the Influence of Copper on the Growth Behavior, Antioxidative Status, and Histology of the Intestine and Liver of Striped Catfish (Pangasianodon hypophthalmus). **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 3, p. 1331–1338, 1 mar. 2022.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT Statistical Database**. FAO, 2022.

FRY, R. S. et al. Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress,and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs,. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 9, p. 3112–3119, 1 set. 2012.

GAO, S. et al. Amino acid facilitates absorption of copper in the Caco-2 cell culture model. **Life sciences**, v. 109, n. 1, p. 50–56, 25 jul. 2014.

GATTÁS, G.; BARBOSA, F. F. Cobre na nutrição de aves e suinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 3, p. 117–133, 2004.

GHEISARI, A. A. et al. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. **Biological Trace Element Research**, v. 142, n. 3, p. 557–571, 14 set. 2011.

GILBERT, R. W.; SANDER, J. E.; BROWN, T. P. Copper sulfate toxicosis in commercial laying hens. **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 236–239, 1996.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2763–2813, 1 abr. 2018.

GOMIDE, M. H. et al. Use of scanning electron microscopy for the evaluation of intestinal epithelium integrity. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1500–1505, 2004.

HA, J. H.; DOGUER, C.; COLLINS, J. F. Consumption of a high-iron diet disrupts homeostatic regulation of intestinal copper absorption in adolescent mice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 313, n. 4, p. G353–G360, 1 out. 2017.

HARRIS, Z. L. et al. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 7, p. 2539–2543, 28 mar. 1995.

HASHIMOTO, A.; KAMBE, T. Mg, Zn and Cu Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 61 Suppl, p. S116–S118, 24 nov. 2015.

HUANG, C. et al. Effects of Subchronic Copper Poisoning on Cecal Histology and Its Microflora in Chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 739577, 8 set. 2021.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, 2022.

JACKSON, N. The effect of dietary copper sulphate on laying performance, nutrient intake and tissue copper and iron levels of the mature, laying, domestic fowl. **The British journal of nutrition**, v. 38, n. 1, p. 93–100, jul. 1977.

JIN, L. et al. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 9, p. 2270–2278, 1 set. 1994.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KISIELINSKI, K. et al. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 3, p. 131–135, 2002.

KRÁS, R. V. et al. Effect of dietary fiber and genetic strain on the performance and energy balance of broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, n. 1, p. 15–19, 2013.

KUO, Y. M. et al. Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex-linked anaemia mouse. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 201–206, fev. 2004.

LAMOT, D. M. **First week nutrition for broiler chickens - Effects on growth, metabolic status, organ development, and carcass composition**. Wageningen: Wageningen University, 2017.

LARA, L. J. C.; AMARAL, L. M. M.; TRIGINELLI, M. V. Nutrição e alimentação nas fases de cria e recria. Em: FARIA, D. E. DE et al. (Eds.). **Produção e processamento de ovos de poedeiras comerciais**. 1. ed. São Paulo: FACTA, 2019. p. 86–98.

LEARY, S. C. et al. COX19 mediates the transduction of a mitochondrial redox signal from SCO1 that regulates ATP7A-mediated cellular copper efflux. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 6, p. 683–691, 15 mar. 2013.

LEVKUT, M. et al. THE EFFECT OF INORGANIC OR ORGANIC ZINC ON THE MORPHOLOGY OF THE INTESTINE IN BROILER CHICKENS. 2017.

LI, J. Y. et al. Effects of cage size on growth performance, blood biochemistry, and antibody response in layer breeder males during rearing stage. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3571–3577, 1 set. 2019.

LINDER, M. C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 8, n. 9, p. 887–905, 1 set. 2016.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 797S-811S, 1 maio 1996.

LONNERDAL, B. et al. Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 1301–1306, 1 nov. 1988.

LUCAS, A. M.; DENINGTON, E. M. Morphology of the Chicken Liver. **Poultry Science**, v. 35, n. 4, p. 793–806, jul. 1956.

LUCERO, H. A.; KAGAN, H. M. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 63, n. 19–20, p. 2304–2316, out. 2006.

MABE, I. **Efeitos da suplementação dietética com quelatos de zinco e de manganês na produção de ovos e morfologia intestinal de galinhas poedeiras.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001.

MAIORKA, A. et al. Posthatching Water and Feed Deprivation Affect the Gastrointestinal Tract and Intestinal Mucosa Development of Broiler Chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, p. 483–492, 1 dez. 2003.

MAIORKA, A. et al. Effect of broiler breeder age on pancreas enzymes activity and digestive tract weight of embryos and chicks. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 1, p. 19–22, mar. 2004.

MEDEIROS, D. M. Copper, iron, and selenium dietary deficiencies negatively impact skeletal integrity: A review. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 12, p. 1316–1322, 1 jun. 2016.

MORITA, V. S. Efeito da pectina cítrica sobre o desenvolvimento e a saúde intestino delgado de frangos de corte. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2011.

MCDOWELL, L. R. Minerals in animal and human nutrition. **Academic Press**, p. 524, 1992.

MCHARGUE, J. S. Futher evidence that small quantities of copper, manganese and zinc are factors in the metabolism of animals. Animal Journal Physiology, v. 77, p. 245-255. 1926.

NGUYEN, H. T. T. et al. Sources and levels of copper affect liver copper profile, intestinal morphology and cecal microbiota population of broiler chickens fed wheat-soybean meal diets. **Scientific Reports 2022 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 10 fev. 2022.

OPSAHL, W. et al. Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon. **The Journal of nutrition**, v. 112, n. 4, p. 708–716, 1982.

OZAYDIN, T.; CELIK, I. Histological, histochemical and immunohistochemical investigations on the developing small intestines of broiler embryos. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 16, p. 2936–2944, 2012.

PAL, D. T. et al. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 24, n. 2, p. 89–94, abr. 2010.

PAULETTI, P. et al. Insulin-like growth factor-I, passive immunity transfer, and stereological characteristics of small intestine of newborn calves. **Animal Science Journal**, v. 78, n. 6, p. 631–638, 1 dez. 2007.

PETEK, M. et al. The influence of different lighting programs, stocking densities and litter amounts on the welfare and productivity traits of a commercial broiler line. **Veterinarija Ir Zootechnika**, 2010.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1–3, p. 215–236, 1 nov. 1997.

PROHASKA, J. R. Role of copper transporters in copper homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 3, p. 826S-829S, 1 set. 2008.

ROBERTS, E. A. Using metalloproteomics to investigate the cellular physiology of copper in hepatocytes. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 4, n. 7, p. 633–640, 2012.

ROSTAGNO, M. H. Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 4, p. 1–9, 6 abr. 2020.

RUAN, Y. et al. High Doses of Copper and Mercury Changed Cecal Microbiota in Female Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 189, n. 1, p. 134–144, 15 maio 2019.

SAUER, A. K. et al. Characterization of zinc amino acid complexes for zinc delivery in vitro using Caco-2 cells and enterocytes from hiPSC. **BioMetals**, v. 30, n. 5, p. 643–661, 1 out. 2017.

SAGHER, F. A.; DODGE, J. A.; JOHNSTON, C. F.; SHAW, C.; BUCHANAN, K. D.; CARR, K. E. Rat small intestinal morphology and tissue regulatory peptides: effects of high dietary fat. **British Journal of Nutrition**, 65(1), 21–28. 1991.

SCOTT, A. et al. Effect of different levels of copper nanoparticles and copper sulphate on performance, metabolism and blood biochemical profiles in broiler chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. e364–e373, 1 fev. 2018.

SECHINATO, A. DA S.; DE ALBUQUERQUE, R.; NAKADA, S. Effects of diet supplementation with organic trace minerals on production of laying hens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 159–166, 1 abr. 2006.

SHAMOTO, K.; YAMAUCHI, K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. **Poultry Science**, v. 79, n. 5, p. 718–723, 1 maio 2000.

SILVA, L. M. **Fontes de microminerais sobre a histologia intestinal, parâmetros ósseos e composição da gema de poedeiras**. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia—[s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2020.

SHIMIZU, G.; MARUBAYASHI, R.; GONCALVES, L. **AgroR**: Experimental Statistics and Graphics for Agricultural Sciences. 2023.

SOARES, K. R.; XIMENES, L. F. Agropecuária: Ovos. **Caderno Setorial Etene**, 2023.

STERZO, E. V. **Avaliação morfológica do intestino e hematológica de aves de corte (Gallus gallus domesticus) infectados experimentalmente por Salmonella enteritidis e submetidos ao tratamento por exclusão competitiva**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2007.

SU, Y. et al. The detoxification effect of vitamin C on zearalenone toxicity in piglets. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 158, p. 284–292, 30 ago. 2018.

SUTTLE, N. **Mineral Nutrition of Livestock**. [s.l.] CABI, 2010.

TÜMER, Z.; MØLLER, L. B.; HORN, N. Mutation spectrum of Atp7a, the gene defective in Menkes disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 448, p. 83–95, 1999.

UNI, Z. et al. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **British poultry science**, v. 41, n. 5, p. 544–551, 2000.

UNI, Z. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry science**, v. 82, n. 11, p. 1747–1754, 2003.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks. **Poultry science**, v. 74, n. 10, p. 1622–1629, 1995.

WEN, Y. et al. Different copper sources and levels affect growth performance, copper content, carcass characteristics, intestinal microorganism and metabolism of finishing pigs. **Animal Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 321–330, 1 mar. 2022.

XIA, M. S.; HU, C. H.; XU, Z. R. Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 118, n. 3–4, p. 307–317, 4 fev. 2005.

YIN, L. et al. Dietary Copper Improves Intestinal Morphology via Modulating Intestinal Stem Cell Activity in Pigs. 2021.

YU, Y. et al. Kinetics of Zinc Absorption by In Situ Ligated Intestinal Loops of Broilers Involved in Zinc Transporters. **Poultry Science**, v. 87, n. 6, p. 1146–1155, 1 jun. 2008.

YUE, X. et al. Dietary Chitosan-Cu Chelate Affects Growth Performance and Small Intestinal Morphology and Apoptosis in Weaned Piglets. **Czech J. Anim. Sci**, v. 62, n. 1, p. 15–21, 2017.

ZAEFARIAN, F. et al. Avian Liver: The Forgotten Organ. **Animals 2019, Vol. 9, Page 63**, v. 9, n. 2, p. 63, 15 fev. 2019.

ZAFAR, M. H.; FATIMA, M. Efficiency Comparison of Organic and Inorganic Minerals in Poultry Nutrition: A Review. **PSM Veterinary Research**, v. 3, n. 2, p. 53–59, 31 dez. 2018.

ZEA, O. M.; VÍLCHEZ, C. P. Effect of supplementation with copper sources on broiler performance, intestinal morphology and liver copper content. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 25, p. 16–28, 1 jan. 2014.

ZHANG, B. et al. Zinc prevents Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced loss of intestinal mucosal barrier function in broiler chickens. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, v. 41, n. 4, p. 361–367, ago. 2012.